

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-007594

(43)Date of publication of application : 14.01.1991

(51)Int.Cl. C12P 21/02
C07K 13/00
C12N 1/21
C12N 15/30
C12N 15/73
C12P 21/08
// A61K 37/02
A61K 39/012
C12N 5/20
C12N 15/06
(C12P 21/02
C12R 1:19)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 01-140268

(71)Applicant : F HOFFMANN LA ROCHE AG

(22)Date of filing : 03.06.1989

(72)Inventor : ALTENBURGER WERNER
BINGER MARY-HELEN
CHIZZONITE RICHARD ANTHONY
KRAMER RICHARD ALLEN
LOMEDICO PETER THOMAS
STEPHAN J MCANDREW

(30)Priority

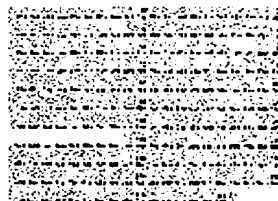
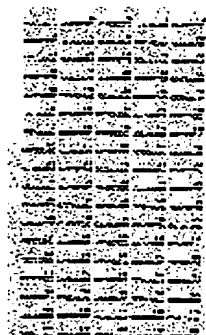
Priority number : 88 202721 Priority date : 03.06.1988 Priority country : US

(54) RECOMBINANT COCCIDIOSIS VACCINES

(57)Abstract:

PURPOSE: To protect poultry against coccidiosis by culturing host microorganisms transformed by recombinant vectors containing DNA coding a specific protein.

CONSTITUTION: These recombinant coccidiosis vaccines are produced as follows: at first, (A) a monoclonal antibody 6A5 is obtained by immunizing a mouse with sporozoite isolated from *Eimeria tenella*. Next, (B) a nucleotide sequence of formula I in a 1.1 Kb cDNA molecule coding a 20 Kb protein is obtained by recognize-searching with the component A. Then, (C) an amino acid sequence of formula II obtained by preparing from the component B is contained to obtain (D) a protein containing immunoreactive and/or antigenic more than one kinds of determination factors of *Eimeria* surface antigens specifically bonding with more than one kinds of monoclonal antibodies having an apparent molecular weight of about 28, 37, 120 or ≥ 200 Kd and nominated as accession numbers of HB 9707-9712 in the American type culture collection. Thus, the objective recombinant coccidiosis vaccines are produced by including the component D and a biologically permissible carrier.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-7594

⑬ Int.Cl.⁹

C 12 P 21/02

識別記号

ZNA C

庁内整理番号

8214-4B

8717-4B

8717-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)1月14日

C 12 N 15/00

A

C※

審査請求 未請求 請求項の数 28 (全62頁)

⑮ 発明の名称 組換えコクシジウム症ワクチン類

⑯ 特 願 平1-140268

⑰ 出 願 平1(1989)6月3日

優先権主張 ⑱1988年6月3日⑲米国(US)⑳202721

⑳ 発 明 者 ウエルナー アルテン スイス国 CH-4125 リーエン, エステルリウエク
バーガー 135㉑ 発 明 者 メリーーヘレン ビン スイス国 CH-4103 ボトミンゲン シェターレンスト
ガー ラツセ 4㉒ 出 願 人 エフ・ホフマン・ラ・ スイス国 パーセル・グレンツアーヘルストラツセ
ロシュ・ウント・コン 124-184
パニー・アクチエンゲ
ゼルシャフト㉓ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

組換えコクシジウム症ワクチン類

2. 特許請求の範囲

1. 表面抗原が、約28、37、120または200kdよりも大きい見かけの分子量を有し、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されており、かつ寄託番号HB 9707 からHB 9712 が割り当てられた1種もしくはそれ以上のモノクローナル抗体類に特異的に結合するアイメリア表面抗原の免疫反応性および/または抗原性の1種もしくはそれ以上の決定因子類を有する蛋白質。
2. 第15図中に示されたアミノ酸配列を有する請求項1に記載の蛋白質またはそれと機能的に同等な蛋白質。
3. 第17図中に示されたアミノ酸配列を有する請求項1に記載の蛋白質またはそれと機能的に同等な蛋白質。
4. 第19図中に示されたアミノ酸配列を有する請

求項1に記載の蛋白質またはそれと機能的に同等な蛋白質。

5. 第21図中に示されたアミノ酸配列を有する請求項1に記載の蛋白質またはそれと機能的に同等な蛋白質。
6. 請求項1ないし5のいずれかの一に記載の蛋白質をコードするDNA配列。
7. 第14図中に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を包含する請求項6に記載のDNA配列。
8. 第16図中に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を包含する請求項6に記載のDNA配列。
9. 第18図中に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を包含する請求項6に記載のDNA配列。
10. 第20図中に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を包含する請求項6に記載のDNA配列。
11. 請求項6ないし10のいずれかの一に記載の

- DNA 配列を包含する組換えベクター。
12. 適合しうる宿主微生物中に於けるDNA 配列の発現を支配しうる請求項11に記載の組換えベクター。
 13. ポックスウイルスベクターである請求項11または12に記載の組換えベクター。
 14. E.coliベクターである請求項11または12に記載の組換えベクター。
 15. pEV/2-4 である請求項14に記載の組換えベクター。
 16. 請求項11ないし15のいずれかの一に記載の組換えベクターで形質転換させた宿主微生物。
 17. 前記請求項に記載された組換えベクター中に包含された請求項1ないし5のいずれかの一に記載された蛋白質をコードするDNA 配列を発現しうる請求項16に記載の形質転換宿主微生物。
 18. 請求項1ないし5のいずれかの一に記載された蛋白質に支配される抗体。
 19. モノクローナル抗体である請求項18に記載の抗体。

種もしくはそれ以上の蛋白質および生理学的に許容しうる担体を包含するコクシジウム症に対して家禽を保護するためのワクチン。

25. 請求項13に記載の組換えポックスウイルスベクターを包含するコクシジウム症に対して家禽を保護するためのワクチン。
 26. コクシジウム症に対して家禽を保護しうるワクチンの製造のための請求項1ないし5のいずれかの一に記載の蛋白質の使用。
 27. 請求項1から5のいずれかの一に記載の蛋白質で、請求項22に記された様な行程により製造されたものの全てのもの。
 28. 請求項16或いは17に記載の形質転換宿主微生物で請求項23に記された様な行程により製造されたものの全てのもの。
3. 発明の詳細な説明

コクシジウム症(coccidiosis)は、アイメリア(Elmeria)属の細胞内の原虫類の寄生物類(protozoan parasite)による家禽の疾患である。この疾患は、大規模な風土病であり、集約的な家

20. ATCC番号 HB 9707、HB 9708、HB 9709、HB 9710、HB 9711 および HB 9712から成る群から選ばれた請求項19に記載のモノクローナル抗体。
21. コクシジウム症に対する家禽の免疫化のための請求項1ないし5のいずれかの一に記載の蛋白質。
22. 請求項1ないし5のいずれかの一に記載の蛋白質の製造方法に於いて、
 - (a) 該蛋白質をコードするDNA 配列を包含する組換えベクターで形質転換させた宿主微生物を、DNA 配列が発現する条件下に培養し；更に
 - (b) 培養物から蛋白質を単離することと特徴とする蛋白質の製造方法。
23. それ自体公知の方法で、宿主微生物を請求項11ないし15のいずれかの一に記載の組換えベクターで形質転換させることを特徴とする請求項16または17に記載の形質転換宿主微生物の製造方法。
24. 請求項1ないし5のいずれかに記載された1

禽の育種の確立および化学療法による該疾患の管理の見積もり費用は、米国だけでも毎年100億ドルを超える。抗コクシジア薬に対する耐性の発現は、新規薬剤の継続的な開発を必要とし、同時に薬剤の開発にますます費用が掛かりつつあり、かつ消費者の食用動物類中の薬剤残留に対しての容認がますます小さくなる。

自然のコクシジウム症の感染に対する保護的免疫は、よく典拠されている。管理された数週間にわたる、少数の成育可能な接合子嚢(oocyst)の毎日の投与は、通常には有毒な投与量の誘発的な感染(challenge infection)に対して完全な免疫をもたらすことが示されている(RoseらのParasitology 73:25(1976); RoseらのParasitology 88:199(1984))。感染に対して獲得された抵抗力の証明は、化学的なコクシジウム症薬に対する要求を迂回して、若いニワトリに免疫を誘発するワクチンの構築ができることを示唆している。事実、その様な考えは、米国、アラバマ州、オベリカ、Sterwin Laboratories、Coccivac(商標)薬剤に

ついて試験されている。

コクシジウム症ワクチンの製造の目的で、Murrayら（ヨーロッパ特許出願、発行番号167,443）は、それらの多くが孢子小体（スポロゾイト：sporozoite）の表面に会合していた少なくとも15種のポリペプチドを含有する *Eimeria tenella* の孢子小体類または孢子化接合子嚢（オーシスト：oocyst）類からの抽出物類を調製した。これらの抽出物類のニワトリへの注射は、*E. tenella* の毒性量の孢子化接合子嚢の経口接種の結果である。盲腸障害（cecal lesions）を減少させた。更に最近、Schenkelら（米国特許第4,650,676）は、*E. tenella* の分裂小体（モロゾイト：morozoite）類に対するモノクローナル抗体類の製造を開示した。これらの抗体類を使用して、Schenkelらは、該抗体が支配される多数の抗原を同定した。*E. tenella* の孢子小体類とそれらの抗体類の前培養、続いての処理された該孢子小体類のニワトリの盲端（ceca）への挿入によって、Schenkelらは、孢子小体で処理されなかった対照に比べて盲腸障害の評価値が

によって記述されている。これらは多くの技術の状況を説明しているので、これらの参考文献を参照して以下に示す。

多くの条件が適合する場合に限り、一度調製された組換えDNA分子類は、挿入された遺伝子配列によって特定された生成物を調製するのに使用されることができる。組換え分子が適合しえ、従って、宿主細胞中で自律的に複製しうるということが第1位の必要条件である。ごく最近の研究には、広範囲の組換えプラスミド類に適合するため、宿主微生物として *Escherichia coli* が使用されている。使用されるベクター／宿主細胞系に応じて、組換えDNA分子は、形質転換、トランスダクションまたはトランスフェクションによって宿主中に導入される。

宿主細胞中の組換えプラスミド類の存在の検出は、プラスミドマーカ活性、例えば抗生物質耐性を使用することによって都合よく達成される。従って、アンピシリン分解酵素の産生をコードするプラスミドを有する宿主は、アンピシリンを含

やや低下することを示すことができた。

組換えDNA技術に於ける進展は、他の取り組み、すなわち、サブユニットワクチン（subunit vaccine）類の入手を可能にしている。現在の組換えDNA法の応用に於いて、特定のDNA配列が、適当なDNAベヒクルまたはベクターに挿入され、宿主細胞中で複製できる組換えDNA分子類を形成する。プラスミドと称される環状二重鎖DNA分子類は、ベクター類として頻繁に使用されており、また該組換えDNA形態類の調製は、特定の塩基配列部位に於て開裂できる制限エンドヌクレアーゼ酵素類の使用を伴う。一旦、プラスミド中および挿入されるべき外来DNAの分節中に、制限酵素によって切断がなされた後には、2種のDNA分子を、リガーゼとして知られている酵素によって共有的に結合し得る。この様な組換えDNA分子類の一般的な調製方法は、Cohenら（米国特許第4,237,224号）、Collinsら（米国特許第4,304,863号）およびManiatisら（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory）

有する培地中で、宿主を成育させることにより非改造細胞（unaltered cell）から選択することができた。更に別の利点は、選択された制限スクレーパーが切断し、更に外来遺伝子が挿入される部位に於いて、第2番目の抗生物質分解活性をコードするプラスミドである抗生物質耐性マーカーを取っても良いことである。次に組換えプラスミドを正しく含有している宿主細胞は、第1番目の抗生物質に耐性であるが第2番目のものには感受性であることによって特徴付けられる。

宿主細胞中への組換えプラスミドの単なる挿入および変更された宿主の単離は、寄量の所望の遺伝子産物が産生されるということをそれ自体で保証するものではない。これが生ずるため、外来遺伝子配列は、プロモーターと称されるDNA転写のためのシグナル領域と正しい関係でプラスミド中に融合されなければならない。別法として、外来遺伝子は、これが宿主によって認識される限り、それ自体のプロモーターを有していても良い。その由来を問わず、プロモーターは、RNAポリメラ

ーゼの結合を支配し、従って、メッセンジャーRNA (mRNA) に対するDNAの転写を“促進する”DNA配列である。

多量のmRNAを与えることができる強い促進が与えられた場合に、所望の遺伝子産物の最終的な産生は、mRNAから蛋白質への変換の有効性に依存するであろう。また逆にこれは、mRNAに対するリボソーム結合の効率に依存する。E.coli中、mRNA上のリボソーム結合部位は、開始コドン(AUG)および上流のシャイン・ダルガーノ(SD)配列を包含する。3-9個のヌクレオチドを包含し、そしてAUGコドンから3-11個のヌクレオチドに位置するこの配列は、E.coli 16SリボソームRNA(rRNA)の3'末端に相補的である〔ShinおよびDalgarno, *Nature*254:34(1975)〕。明らかに、mRNAに対するリボソーム結合は、mRNA中のSD配列と16S rRNA 3'末端に於ける配列との間の塩基対によって促進される。遺伝子発現の最大化に対しての再吟味のためには、Roberts および Lauerの *Methods in Enzymology*68:473(1979)を参照。

サーを不活性化させるためにβ-D-チオガラクトシピラノシド(IPTG)を用いて該融合蛋白質の発現の誘発に続いて該ライブラリーの免疫スクリーニングにより同定される。この発現ベクター系は、DNAの充填およびそのE.coli細胞中への導入におけるファージ系の効率とβ-ガラクトシダーゼとのポリペプチドの融合の安定性の増加とを兼ね備える。

ワクチンサブユニットの研究による方法では、完全な伝染性の生物のサブユニットは、免疫学的に適切な情況下、宿主動物に搬入される。該サブユニットは、寄生物からの精製された蛋白質、組換え蛋白質または異種の系に於いて発現された蛋白質の断片、単一の中和決定因子から成る合成ペプチドまたはウイルス性のベクター、例えばワクチンによって導入された蛋白質であっても良い。該宿主免疫系は、寄生物全体にさらされることなしに、サブユニットに対する特異的応答を果す。それまでにさらされたことのあるワクチンサブユニットによってのみ指示されると、染色性の生物

別の発現系が、ラムダファージベクターとの組合せに於いて lacZ オペロンに基づいての開発がなされている(Huynhらの *In DNA Cloning*: 1巻、D.M.Glover, Ed.)。この系に於いて、その発現を制限する誘発可能なプロモーターを伴ったβ-ガラクトシダーゼの構造遺伝子が、ファージベクター中に巧みに処理されている。β-ガラクトシダーゼに対する遺伝子の3'末端における特異的なクロニング部位は、mRNAのcDNAの複製または蛋白質コード領域を包含するゲノムDNA断片の挿入によって遺伝子の融合をもたらす。

挿入物がβ-ガラクトシダーゼのための読み出しわくとして同一のレジスター中に開始読み出しわくを包含する場合に於いて、β-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は、114kdのβ-ガラクトシダーゼおよびcDNA挿入物によってコードされたカルボキシ末端ポリペプチドを含む融合蛋白質の産生をもたらす。生成物がモノクローナルまたはポリクローナル抗血清によって認識される様な遺伝子を包含するファージは、従って、lacZ レプレッ

の有毒な投与量に対する誘発によって、該宿主免疫系は、好結果の防御を果す。

証拠は、コクシジウム症に対する獲得耐性に於いては循環している抗体類、腸管上皮中の分泌IgA〔Davisらの *Immunology* 34:879(1978)〕、および細胞伝達免疫系〔Giambroniらの *Poultry Science* 59:38(1980)〕が関与している文献中に見出される。再吟味のためにP.S.Davis in *Avian Immunology*, M.E.Rose 著、*British Poultry Science, Ltd.* エデンバーグ pp.361-385(1981)参照。免疫系の各種の支流のありうるかかわりは、完全でまた永続する保護が、自然な感染の過程の特異的な面をまねる能力を必要とするであろうことを意味する。これらの面は、保護が望まれる部位に於ける局所的な露呈、配列抗原加工細胞に対しての炎症性の応答の喚起、適切な寄生物の抗原の提示およびおそらく特別な膜配列に於けるMHC決定因子との会合を含む。

本発明は、アイメリア表面抗原の免疫反応性および/または抗原性の1種もしくはそれ以上の決

定因子を有する精製された蛋白質またはその断片を提供する。

更に詳しくは、本発明は、表面抗原が約28、37、120または200kd(Kilodalton)よりも大きい見かけの分子量を有し、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection: ATCC) に寄託されており、かつ寄託番号 HB 9707から HB 9712が割り当てられた1種もしくはそれ以上のモノクローナル抗体類に特異的に結合するアイメリア表面抗原の免疫反応性および／または抗原性の1種もしくはそれ以上の決定因子を有する蛋白質を提供するものである。該蛋白質の例は、第15図、第17図、第19図および第21図に示されたアミノ酸配列を有する蛋白質およびこれと機能的に同等な蛋白質である。該機能的に同等な蛋白質は、付加、削除、挿入およびアミノ酸置換による前記したアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列を有する蛋白質類であり、これらの蛋白質は、アイメリア表面抗原の免疫反応性および／または抗原性の1種もしくはそれ以上の

組換えベクターで形質転換させた宿主微生物を、DNA 配列が発現する条件下に培養し；更に

(b) 培養物から蛋白質を単離することを特徴とする蛋白質の製造方法を提供するものである。

更にまた本発明は、それ自体公知の方法を使用し、本発明の蛋白質をコードするDNA 配列を包含する組換えベクターで宿主微生物を形質転換させることを特徴とする前記形質転換宿主微生物の製造方法を提供するものである。

更にまた本発明は、1種もしくはそれ以上の本発明の蛋白質類および生理学的に許容しうる担体を包含するコクシジウム症に対して家禽を保護するためのワクチン類を提供するものである。

更にまた本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA 配列またはその断片を包含し、該DNA 配列または断片を発現しうるウイルス性のベクターおよび生理学的に許容しうる担体を包含するコクシジウム症に対して家禽を保護するためのワクチン

決定因子を有する蛋白質類である。該蛋白質類を、コクシジウム症に対する家禽の免疫化に使用してもよい。

更に本発明は、前記蛋白質類に対して支配される抗体類、特に例えば寄託番号 HB 9707、HB 9708、HB 9709、HB 9710、HB 9711および HB 9712を伴うモノクローナル抗体を提供する。

更にまた本発明は、前記蛋白質類をコードするDNA 配列類、該DNA 配列類を包含する組換えベクター類、特に適合しうる宿主微生物類中で該DNA 配列類の発現を支配しうる組換えベクターおよび該組換えベクターで形質転換された宿主微生物類、特に前記蛋白質をコードする該組換えベクター中に包含されたDNA 配列類を発現しうる形質転換宿主微生物類を提供するものである。

更にまた本発明は、アイメリア表面抗原の免疫反応性および／または抗原性の1種もしくはそれ以上の決定因子類を有する蛋白質の製造方法に於いて、

(a) 該蛋白質をコードするDNA 配列を包含する

類を提供するものである。

更にまた本発明は、コクシジウム症を受けやすい若い鳥に有効量の本発明のワクチンを投与することを特徴とするコクシジウム症に対して家禽を保護するための方法を提供するものである。

本発明は、本発明の以下の記載および以下の図面と関連する実施例によってより容易に理解されるであろう。

第1図は、*E. tenella*のスプロゾイト類のELISAの結果を示す。免疫マウス血清 (MS 107-2; Δ) および対照マウス血清 (X) の希釈物を、 4×10^4 の生精製スプロゾイト類と共に培養させた。スプロゾイト類に結合した特異的抗体を、ペルオキシダーゼ接合抗マウスIgG 抗体およびペルオキシダーゼ基質のo-フェニレンジアミンで測定した。OD₄₉₂がTitertek Multiscan (商標) プレート読み取り機によって読まれた。

第2図は、*E. tenella*のスプロゾイトから可溶化させた蛋白質類を用いて行なったウエスタン・ブロット検査の結果を示す。可溶化させたスプロ

ゾイト蛋白質類を、12.5%のゲル中、還元性SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離させ、ニトロセルロース膜に移し、更に各抗体と反応させた。各抗体によって認識された特異的蛋白質類を、ペルオキシダーゼ接合抗マウスIgG抗体およびペルオキシダーゼ基質の4-クロロ-1-ナフトールで可視化させた。各帯と反応させた抗体は、該帯の上部に示されている。

第3図は、*E. tenella* のスポロゾイトおよびモロゾイトおよび*E. acervulina*のスポロゾイトから可溶化させた蛋白質類を用いて行なったウエスタン・ブロット検査の結果を示す。各種のモノクローナル抗体類および血清類を、ニトロセルロース結合アイメリア蛋白質と共に培養させ、更に第2図の説明で述べられていると同様に可視化させた。使用したモノクローナル抗体類は、3A5 (1)、20C6 (2)、7D1 (3)、13A6 (4)、6A5 (5)およびアイメリア蛋白質に不反応であった対照抗体を包含していた。使用した血清は、マウス番号107-2 免疫血清(7)および対照血清(8)を包含していた。

スポロゾイト表面蛋白質類の免疫沈澱の結果を示す。各抗体による¹²⁵I-蛋白質結合の同定の方法は、第4図の記述に説明されている。使用された特異的スポロゾイトおよび対照抗体(対照)は、各レーンの上部に示されている。標準マーカー蛋白質の分子量は、kdで示されている。

第6図は、空気乾燥させた*E. tenella* のスポロゾイトの固体調製物類の相対比顕微鏡写真および各種のモノクローナル抗体類を使用する免疫蛍光検査の染色模様顕微鏡写真を示す。パネルA、B、CおよびDの左側は、大きな後方の屈折性組織(large posterior refractile body)(PBR)、小さな前方の屈折性組織(small anterior refractile body)(ARB)および該後方の屈折組織の反対側の先端末(A)による完全に伸長されたスポロゾイト類を示す相対比顕微鏡写真である。パネルA、B、CおよびDの右側は、それぞれモノクローナル抗体14C3(表面抗体に特異的)、6A5(表面および屈折性組織蛋白質に特異的)、11D2(スポロゾイト先端の先端部に特異的)および対照抗体

第4図の左のパネルは、*E. tenella* のスポロゾイトの¹²⁵I-標識表面蛋白質類による免疫沈澱検査の結果を示す。スポロゾイト表面蛋白質類を、¹²⁵I-DOGEN または¹²⁵I-DOBEADS 法のいずれかで標識し、オートラジオグラフィーによる12.5%のゲル中でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に続いて可視化させた。右のパネルは、生スポロゾイト類で免疫させたマウスからの血清による¹²⁵I-標識スポロゾイト表面蛋白質類の免疫沈澱の結果を示す。免疫マウス血清(105-1、105-2、105-3、107-1、107-2 および107-3)および対照マウス血清(対照)を、¹²⁵I-スポロゾイト表面抗体と共に培養し、免疫複合体を、アガロースに結合した抗マウス抗体によって捕らえた。該免疫複合体を、Laemmli 試料緩衝液で可溶化させ、12.5%のゲル中、SDS-ゲル電気泳動によって分離させ、オートラジオグラフィーによって可視化させた。Mは、kd(kilodalton)での標準マーカー蛋白質の分子量を示す。

第5図は、モノクローナル抗体による¹²⁵I-ス

で処理されたスライドを示す。ポリペプチドに結合した抗体は、ローダミン結合抗マウス抗体類によって局在化させ、Leitz Dialux 22(商標)顕微鏡を使用するエピ蛍光(epifluorescence)によって可視化させた。全ての顕微鏡写真は、630倍である。

第7図は、細胞内のスポロゾイト類の抗体染色およびニワトリ腎臓細胞内に於ける発育寄生物を示す。ニワトリ腎臓細胞を、スポロゾイト類で感染させ、感染後、示された時間に細胞は、抗体染色処理された。固定の前に、培養物を洗浄し、全ての細胞外のスポロゾイト類を除去した。相対比および対応する免疫蛍光顕微鏡写真を、示された様に抗体類7D4、8A2、7B2 および15A3を使用して作成した。調製物に結合した抗体類をローダミン結合抗マウス抗体類によって局在化させ、エピ蛍光によって可視化させた。全ての顕微鏡写真は、630倍である。

第8図は、細胞内のスポロゾイト類の抗体染色およびニワトリ腎臓細胞内に於ける発育寄生物

を示す。相対比および対応する免疫蛍光顕微鏡写真を、示された時間に、モノクローナル抗体類 14B1および1906、免疫ひよこ血清および蛍光第2抗体を使用して作成した。

第9図は、抗スポロゾイト抗体類による細胞内のスポロゾイトの発育の中和を示す。精製された *B. tenella* のスポロゾイト類を、40℃で1時間、対照抗体 (×) かまたは抗スポロゾイト抗体類 7D4 (□)、8A2 (○)、14B1 (●) あるいは6A5 (■) かと共に前培養させ、次いでMDBX細胞培養物で感染させた。更に、スポロゾイト類を、培地 (△) または抗コクシジジア薬、ラサロシド (lasalocid) (×) と共に前培養させた。

感染後、細胞内のスポロゾイトの発育を、細胞培養物中への ³H-ウラシルの取り込みによって測定した。ラサロシドは、スポロゾイトの細胞内の発育を阻止するため、この薬剤と共に調製された培養物は、³H-ウラシル最小取り込みを示した。

第10図は、示されている様に、65 Kd-β-ガラクトシダーゼ融合蛋白質試料または他の試料の

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の1ウェスタン・ブロット分析の結果を示す。ウェスタン・ブロット分析は、マウス抗-β-ガラクトシダーゼ抗体 (パネルA) またはヤギ抗マウス HPOD 接合体に接合する貯蔵されたモノクローナル抗体類 7D1、7D4 および20C6 (パネルB) を使用して行なった。両方のパネル中のレーンは、(1) β-ガラクトシダーゼ、(m) 表示された分子量のマーカークラス、その大きさはパネルAの左側にkdで示されている。(2) 全ての細胞ペレット蛋白質、(3) 超音波処理により核細胞ペレットから遊離した蛋白質および(4) 超音波処理後の核ペレットからのグアニジン-HCl で可溶化した蛋白質を示す。

第11図は、ファージλ_{gt10} から1.7 KbのEcoRI DNA 挿入を含み65kdの蛋白質発現プラスミドであるプラスミド pEV/2-4 の模式的表示を示す。挿入中の各種の制限酵素部位の位置が、PstI (P, bp 53および776 に於ける)、KpnI (K, bp 202 に於ける)、BstNI (B, bp 584, 1303および1412に於ける) およびSau3A (S, bp 1017 および1439に於ける) を

含めEcoRI 部位に関して示されている。

第12図は、pEV-vrf3 のEcoRI とSalIとの間に挿入された表示された部位を伴うポリリンカーを含むpEV3-SB9の地図を示す。ダッシュ矢印で示された合成オリゴヌクレオチド CGGTCCGACTCGAGCCA が、鎖停止DNA 配列分析のためのプライマーとして使用された。

第13図は、モノクローナル抗体6A5 で認識される蛋白質をコードするcDNAクローンの制限地図を示す。1.1kb cDNAのMaxam-Gilbert DNA 配列分析のために使用される制限エンドスクレアーゼ部位が示されている。括弧内のEcoRI 部位は、0.9 kb cDNA の末端の位置である。地図上の棒は、充填された潜在的シグナルペプチドを伴う、DNA から断定された開始読みわくを示す。地図の下線は、鎖停止配列分析に使用されたoxoIII削除を示す。

第14図は、モノクローナル抗体6A5 によって認識される20kb蛋白質をコードする1.1 kb cDNA 分子のヌクレオチド配列を示す。

第15図は、第14図のヌクレオチド配列から調製

した蛋白質のアミノ酸配列を示す。

第16図は、モノクローナル抗体7D1、7D4 および20C6によって認識される65kd蛋白質をコードする1.7 kb cDNA 分子のヌクレオチド配列を示す。

第17図は、第16図のヌクレオチド配列から断定され、発現された65kb蛋白質から調製されたトリプシンの蛋白質類の配列分析により確認された蛋白質のアミノ酸配列を示す。該蛋白質類のいくつかに対応する全体にわたるアミノ酸配列中の領域が、下線で示されている。該蛋白質類の測定された配列は、上線付けされている。

第18図は、モノクローナル抗体8A2 によって認識される28kdの蛋白質をコードする1.1 kb cDNA 分子のヌクレオチド配列を示す。

第19図は、第18図のヌクレオチド配列から推定される蛋白質のアミノ酸配列を示す。

第20図は、モノクローナル抗体7B2 によって認識される蛋白質をコードする3.2 kb cDNA 分子のヌクレオチド配列を示す。

第21図は、第20図のヌクレオチド配列から推定

される蛋白質のアミノ酸配列を示す。

第22図は、免疫アフィニティー精製された65kbの蛋白質のSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を示す。ゲルは、コマシーブルー染色およびウェスタン・ブロット分析によって可視化された。レーン2と4および3と5は、2種の調製物からの精製された蛋白質を含む。レーン1と6は、図の左右に示された分子量を有する分子量マーカー蛋白質類の混合物を含む。

第23図は、カラム保持時間を関数とする215nmに於ける吸光度を示す。65kbの蛋白質のβ-メルカプトエタノール還元（パネルA）および未還元（パネルB）トリプシン消化のHPLC溶出曲線を示す。

第24図は、ワクチンウイルスへのコクシジヤ抗体類をコードする遺伝子の組換えに使用される基本ベクターの4種の要素の制限地図を示す。これらの要素は、7.5K プロモーター要素（aおよびb、左）、TK遺伝子座（aおよびb、右）、プラスミド pUC8（c）の一部および M13tg131 から

のポリクローン部位を含む。ウイルス7.5K およびTKプロモーターの転写の方向は、左から右、すなわち、ポリリンカー中、BglII からEcoRI 制限部位である。

第25図は、（A）第24図のベクターのポリリンカー要素中、AUG 翻訳部位コドンを含む構築物から発現させ、（B）マラリアの190kd リーダー切片（始めの34個のアミノ酸）および第24図（次の13個のアミノ酸）のクローンベクターのポリリンカーに融合させたモノクローナル抗体8A2 によって認識されたアイメリア抗原のN-末端のアミノ酸配列を示す。蛋白質の形質転換工程中、N-末端に於ける始めの19個のアミノ酸を、クローンによって示された位置に於いて開裂させても良い。

図中、標準の単一文字の略号は、ヌクレオチド類を示すために使用され、更に標準の1または3つの文字の略号は、アミノ酸類を示すために使用される。それらの略号の意味は、例えばLehninger, Principles of Biochemistry, 1989 Worth Publishers, Inc., ニューヨーク, pp.96,798 等の標準的

生化学の教科書に見出すことができる。

以下に使用されるように、次の用語は、次の意味を持つものとする：

“20kd 蛋白質”は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約20キロダルトンの見かけの分子量を有する組換えまたは合成蛋白質であって、モノクローナル抗体6A5 に特異的に結合するものを意味する。この抗体は、SDS ゲルにおいて約28キロダルトンの見かけの分子量を有するアイメリア表面抗原（アイメリア蛋白質類の全抽出物由来）とも特異的に反応する。この抗原は、スポロゾイト発生段階中に存在する。この蛋白質をコードするcDNA分子のヌクレオチド配列およびそれから推定されるアミノ酸配列は、それぞれ第14図および第15図に示されている。

“65kd 蛋白質”は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約65キロダルトンの見かけの分子量を有する組換えまたは合成蛋白質であって、モノクローナル抗体7D1、7D4 および20C6に特異的に結合するものを意味する。これらの抗体は、

SDS ゲルにおいて約120 キロダルトンの見かけの分子量を有するアイメリア抽出物由来の表面抗原とも特異的に反応する。この抗原は、スポロゾイト、ジゾントおよびメロゾイト発生段階において存在する。この蛋白質をコードするcDNA分子のヌクレオチド配列およびそれから推定されるアミノ酸配列は、それぞれ第16図および第17図に示されている。

“28kd 蛋白質”は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約28キロダルトンの見かけの分子量を有する組換えまたは合成蛋白質であって、モノクローナル抗体8A2 に特異的に結合するものを意味する。この抗体は、SDS ゲルにおいて約37キロダルトンの見かけの分子量を有するアイメリア表面抗原とも特異的に反応する。この蛋白質をコードするcDNA分子のヌクレオチド配列およびそれから推定されるアミノ酸配列は、それぞれ第18図および第19図に示されている。

“45kd 蛋白質”は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約45キロダルトンの見かけの

分子量を有する組換えまたは合成蛋白質であって、モノクローナル抗体7B2に特異的に結合するものを意味する。この抗体は、SDSゲルにおいて約200キログルトン以上の見かけの分子量を有するアイメリア表面抗原とも特異的に反応する。この抗体は、スポロゾイト発生段階において存在する。この蛋白質をコードするcDNA分子のヌクレオチド配列およびそれから推定されるアミノ酸配列は、それぞれ第20図および第21図に示されている。

“アイメリア表面抗原の免疫反応性および／または抗原性の1種もしくはそれ以上の決定因子を有する蛋白質”なる用語は、免疫学的に適合する宿主生物中に免疫応答を誘導することが可能であるか、および／または相補的な抗体に対して特異的に結合することが可能な1以上の領域もしくはエピトープを有する蛋白質を意味する。

遺伝子コードの縮重性のために、第15図、第17図、第19図および第21図に示されるアミノ酸配列をコードし得る多くの可能なヌクレオチド配列（機能的な同等物）があるものと理解されるであ

ろう。また、ベクター中に挿入された該発明のDNA配列および断片のヌクレオチド配列は、そのような配列および断片を含む該組換えベクターが、アイメリア表面抗原の免疫反応性および／または抗原性の1以上の決定因子を有する蛋白質または断片の適当な宿主生物中における産生を支配することができるかぎりにおいて実際の構造遺伝子の部分ではないヌクレオチドも包含することができる。

更には、生物学的および免疫学的活性を本質的に変えることがない蛋白質中のアミノ酸の置換が知られており、そして例えばNeurathらの“The Proteins” Academic Press, New York (1979)、特に第14頁の第6図中に記載されている。最も頻繁に観察されるアミノ酸の置換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Val/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Glyおよびその逆である。

この発明の例証的態様のこのような機能的に同

等なヌクレオチド配列変異体およびアミノ酸置換体は、得られる該蛋白質が、アイメリア表面抗原の免疫反応性および／または抗原性の1種以上の決定因子を保有している限り、本発明の範囲内になる。

“断片”なる用語は、本発明のcDNAまたは蛋白質のうちの一つの部分配列からなるDNA配列または蛋白質を意味する。このような断片は、DNAに対しては制限エンドヌクレアーゼを、また蛋白質に対してはプロテアーゼを用いてより大きい分子を酵素的に開裂することにより製造することができる。しかしながら、本発明の断片は、酵素的開裂の何れかの形態の生成物に限定されるものではなく、何れの酵素的開裂点にも対応しない末端の部分配列を包含する。このような断片は、例えば、ここに与えられている配列を用いて化学合成により作ることができる。DNA断片は、単離されたメッセンジャーRNA(mRNA)から不完全相補的DNA(cDNA)合成により製造することができる。蛋白質断片は、該蛋白質断片をコードするDNAを発

現させることによっても製造することができる。このような蛋白質断片は、それらが免疫反応性および／または抗原性の決定因子を構成するために十分な数のアミノ酸残基を有する場合には、本発明において有用である。一般的には、約7または8残基が必要である。以下に説明するように、それらを免疫反応性とするには、それらのような断片を免疫原性担体分子と結合させる必要があるであろう。

本発明の該蛋白質類は、例えば組換えDNA技術、化学合成またはアイメリア調製物からの単離などのこの分野で知られた多くの方法により製造することができる。

本発明の該蛋白質を製造するために必要なDNAは、第14図、第16図、第18図および第20図に与えられたヌクレオチド配列の情報を使用して、化学的に合成することができる。このような化学合成は、公知のどのような方法によっても行なうことができるが、Matteucciからのホスホルアミダイト固体支持体法(J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981))

が好適である。

別法として、cDNAは、アイメリアmRNAから作ることができる。メンセンジャーRNAは、アイメリアの胞子を形成する卵原細胞またはメロゾイトから標準的な方法により単離することができる。次いでこれらのmRNA試料は、Maniatisらの前出文献のようにして二重鎖cDNAを製造するために使用することができる。このcDNAは、*E. coli*の形質転換に使用できる適当なクローニング用ベクター中に挿入され、cDNAライブラリーが調製される。

次いで、該cDNAライブラリーは、本発明のクローン化遺伝子またはその断片をプローブとして選別され得る。このような遺伝子または断片は、例えば1種類が α 位に ^{32}P を含む4種のデオキシリボヌクレオチド類の存在下で *Poll* DNA ポリメラーゼを使用するニックトランスレーション (Maniatisらの前出文献) により、プローブとして使用するために放射能標識され得る。

下記の実施例においては、mRNAの供給源として *Eimeria tenell* を用いたが、この種由来のクロー

ン化遺伝子は、種々の種間のDNA配列の同一性によって、アイメリアの他の種由来の遺伝子を単離するためのプローブとして使用することができる。

一旦、同定され、そして単離されてのち、本発明の該アイメリア遺伝子は、挿入される遺伝子配列の転写および翻訳に必要な要素を含んだ適当な発現ベヒクル中に挿入される。有用なクローン化ベヒクルは、染色体性、非染色体性および合成のDNA配列、例えば、種々の細菌性プラスミド類、ファージDNA、ファージDNAもしくは他の発現制御配列を用いるべく修飾されたプラスミドのようなプラスミドとファージDNAとの組合せ、またはイーストのプラスミドの分節からなっているもよい。使用可能であり、かつ当業者知られた特定のクローン化ベヒクルは、限定されるものではないが、pEV-vrf プラスミド類 (pEV-vrf 1、-2 および -3) ; SV40 ; アデノウイルス ; 酵母 ; ラムダ-gt-WES-ラムダB ; シャロン4A および28 ; ラムダ-gt-11-ラムダB ; pUC8, 9, 18 および19, pBR 313, 322 および325等のM13誘導ベクター類 ; pAC

105 ; pVA51 ; pACY177 ; pKH47 ; pACYC184 ; pUB110 ; pMB9 ; colB1 ; pSC101 ; pm121 ; RSP2124 ; pCR1 またはRP4 を包含し得る。

クローン化ベクターへのアイメリア遺伝子の挿入は、遺伝子類および所望のクローン化ベヒクルの両者が同じ制限酵素または酵素類により切断されたものであると、これにより相補的なDNA末端が形成されるために、容易に行われる。これを行えない場合には、一本鎖DNAを消化して平滑末端を生成させることによるか、あるいは適当なDNAポリメラーゼを用いて一本鎖末端を充足して同様な結果を達成することにより、切断末端を修飾する必要があるであろう。このようにして、平滑末端の連結が、T4 DNAリガーゼ等の酵素を用いて行なわれるであろう。別法として、所望のいかなる部位も該DNA末端にヌクレオチド配列 (リンカー類) を連結することにより生成させることができる。このようなリンカー類は、制限部位認識配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列を含んでもよい。開裂されたベクターおよびアイメ

リア遺伝子は、Morrow (Method in Enzymology 68: 3 (1979)) により記述されたように、ホモポリマー機テーリング (homopolymeric tailing) により修飾されてもよい。

本発明において使用されうる多くのクローン化ベヒクルは、pBR322中のアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性、pUC8中のアンピシリン耐性および β -ガラクトシダーゼ活性、pEV-vrf2中のアンピシリン耐性のように所望の形質転換体を選択するために使用されうる1種以上のマーカー活性を含んでいる。このようなベクターが挿入された宿主細胞の選択は、該宿主細胞が該ベクター類による寄与である活性を別な形で欠落している場合に非常に単純である。

クローン化ベヒクル中の選択された部位に挿入された該アイメリア遺伝子のヌクレオチド配列は、実際の構造遺伝子の部分ではないヌクレオチドを含んでもよいものと理解されるべきである。別法としては、該遺伝子は、完全な天然型遺伝子の部分のみを含んでもよい。必要とされることの全て

は、クローン化ベヒクル中に挿入された遺伝子断片が、適当な宿主生物中で、アイメリア表面抗原の少なくとも1種の免疫反応性および／または抗原性の決定因子を有するポリペプチドまたは蛋白質の産生を支配し得ることである。

適当な宿主生物の選択は、この分野で知られた多くの因子に影響される。これらの因子は、例えば、選択したベクターとの適合性、該融合プラスミドによりコードされる蛋白質類の毒性、所望の蛋白質の回収の容易性、発現特性、生物学的安全性およびコストを含む。これらの因子のつり合いは見出されねばならず、またすべての宿主が特定の組換えDNA分子の発現に対して同等に有効であるとは限らないと理解されるべきである。

本発明に使用され得る好適な宿主単細胞生物は、限定されるものではないが、植物、哺乳類、または酵母細胞、ならびに *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* および *Actinomyces* 等の細菌を含む。特に好適には、*Escherichia coli* 株MC1061であって、これは、

のように調製され得る。

Eimeria tenella 由来の抗原性蛋白質は、マウス、ラット、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウサギ等の動物を免疫化し、ミエローマ細胞と融合するための抗体産生体細胞を得るために使用される。

抗体産生能を有する体細胞、特にB細胞類は、ミエローマ細胞と融合するために適している。これらの体細胞は、誘発された動物のリンパ節、ヒ臓および末梢血から誘導されてもよい。本発明の好ましい実施態様においては、マウスミエローマ株と比較的高い割合で安定した融合物を生成することもその一部の理由として、マウスヒ臓細胞が使用される。しかしながら、これに代えて、ラット、ウサギ、カエルまたは他の細胞を用いることもできる。

特殊化したミエローマ細胞株が、ハイブリドーマ生成融合処理に使用するためにリンパ球腫瘍から開発されている (KohlerおよびMilsteinの *Eur. J. Immunol.* 6:511(1976); Shlimanらの *Nature* 276:269(1978); Volkらの *J. Virol.* 42:220(1982))。こ

Casadaban らの (*J. Mol. Biol.* 138:179(1980))

により記述されている。この株、またはプラスミドpRK248cltsを含む他の *E. coli* K-12 株が使用できる。他の *E. coli* K-12 株において使用するプラスミドpRK248cltsは、American Type Culture Collectionから入手可能であって、受託番号ATCC 33766 を有している。*E. coli* 株MC1061もまた寄託されており、受託番号ATCC 53338を有している。

組換えクローン化ベクターの宿主細胞中への移動は、種々の方法により行なうことができる。選択した特定のベクター／宿主系従って、このような移動は、形質転換、トランスダクションまたはトランスフェクションにより行なうことができる。一旦このような修飾された宿主細胞が生成された後は、該細胞が培養され、そして蛋白質生成物が培養物から単離される。

本発明のアイメリア蛋白質を産生するクローンは、適当に標識された該蛋白質に特異的な抗体類により同定され得る。モノクローナル抗体類が好適であるが、これらは標準的な方法を用いて以下

これらの細胞株は、少なくとも3つの理由のために開発されている。第1には、非融合であってかつ類似している無限に自己増殖するミエローマ細胞の中からの融合ハイブリドーマの選択を容易にすることである。通常、これは、ハイブリドーマの生育を支えるある種の選択された培地中において、生育が不可能となるような酵素欠損を有したミエローマ類を用いることにより行なわれる。第2の理由は、自体の抗体類を産生するリンパ球腫瘍細胞の本来の能力に由来する。モノクローナル技術を使用する目的は、所望の単一の抗体をハイブリドーマの体細胞成分の遺伝子的制御下で産生する無限の寿命を有した融合ハイブリドーマ細胞株を得ることにある。該ハイブリドーマ細胞による腫瘍細胞に対する抗体の産生を除くため、軽または重免疫グロブリン鎖を産生できないか、あるいは抗体分泌機構を欠失したミエローマ細胞株が使用される。これらの細胞株を選択する第3の理由は、融合に対してのそれらの適合性および効率である。

例えばP3/X63-Ag8、P3/NSI/1-Ag 4-1、SP2/0-Ag-14 およびS194/5.XX0.BU.1 を含めた多くのミエローマ細胞株が、融合細胞ハイブリッドの生成のために使用されることができる。該P3/X63-Ag8 および P3/NSI/1-Ag 4-1細胞株は、Kohlerおよび Milstein (Eur. J. Immunol. 6:511(1976)) により記述されている。Shulman らは、Sp2/0-Ag14ミエローマ株を開発した (Nature 276:269(1978))。該S194/5.XX0.BU.1 株は、Trowbridgeにより報告されている (J. Exp. Med. 148:313(1979))。本発明の実施例においては、該PA1-0 マウス細胞株 (P3/X63-Ag8 の非-Ig-産生サブクローン) が使用された。

抗体産生ヒ属またはリンパ節細胞およびミエローマ細胞の融合物を創生するための方法は、通常、細胞膜の融合を促進する試薬または試薬類 (化学的、ウイルス的または電気的) の存在下において、体細胞とミエローマ細胞とをそれぞれ10:1の割合 (但し、この割合は、約20:1から約1:1まで変えてもよい) で混合することを含む。該融合

操作において使用される体細胞およびミエローマ細胞の供給源としては、同じ種の動物が好ましい。融合方法は、KohlerおよびMilstein (Nature 256:495(1975)およびEur. J. Immunol. 6:511(1976))、Gefferら (Somatic Cell Genet. 3:231(1977)) およびVolkら (J. Virol. 42:220(1982)) により記述されている。これらの研究者らにより使用された融合-促進試薬は、センダイウイルスおよびポリエチレングリコール (PEG) であった。本発明の実施例のための融合操作では、PEG を用いている。

融合操作は、生存可能なハイブリッドを非常に低い頻度で生ずるため (例えばヒ属を体細胞の供給源とした場合、わずか1つのハイブリッドがおよそ 1×10^5 のヒ属細胞毎に得られる)、融合細胞ハイブリッドを残る非融合細胞、特に非融合ミエローマ細胞から選択する方法を持っていることは基本的なことである。所望の抗体-産生ハイブリッドを他に得られた融合細胞ハイブリッドの中から検出する方法もまた必要である。

一般的には、融合細胞ハイブリッドの選択は、

ハイブリッドマの生育を助けるが、通常、無限に分裂を続けるミエローマ細胞の生育を妨げる培地中にて細胞を培養することにより行なわれる。

(融合において用いた体細胞は、インビトロ培養においては長期間の生存を維持しないので問題を有さない。) 本発明の実施例においては、ヒポキサンチン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼを欠損したミエローマ細胞 (HPRT-ネガティブ) を使用した。これらの細胞に対しての選択は、ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン (HAT) 培地中に行なわれ、この培地においては、融合細胞ハイブリッドは、ヒ属細胞のHPRT-ポジティブ遺伝子型のために生存する。別の遺伝子的欠陥 (薬物感受性等) を有したミエローマ細胞は、遺伝子的に適合するハイブリッドの生育を支持する培地中において選択可能であり、これらの使用も可能である。

融合細胞ハイブリッドの選択的培養には、数週間が必要である。この期間の初期には、所望の抗体を産生するハイブリッド類を同定することが必

要であり、これによって、それらは引き続いてクローン化され、そして繁殖される。一般的には、得られたハイブリッドの約10%が所望の抗体を産生するが、これが1から30%までの範囲にあることは異常なことではない。抗体-産生ハイブリッドの検出は、文献に記述されている酵素-結合免疫試験および放射免疫試験 (例えば、Kennetら (編集者) のMonoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses :376-384頁、Plenum Press, New York(1980) 参照) を含む数種の標準的試験方法のいずれか1つにより行なえる。数種の検出方法が、本発明の実施例において用いられた。

一旦、所望の融合細胞ハイブリッドが選択され、個々の抗体-産生細胞株にクローン化された後には、それぞれの細胞株が、2種の標準的な方法のいずれかによって繁殖され得る。該ハイブリッドマ細胞の懸濁液は、組織適合性動物中に注射され得る。該注射された動物は、該融合細胞ハイブリッドにより産生される特定のモノクローナル抗体

を分泌する腫瘍を発生する。血清または腹水等の該動物の体液は、高い濃度でモノクローナル抗体を与えるため採取され得る。別法として、個々の細胞株は、研究室用培養器中でインビトロにおいて繁殖され得る。高濃度の単一の特定モノクローナル抗体を含む培地は、傾瀉、口過または遠心分離により採集され得る。

E. coli 中で産生されるのと同様に、該アイメリア蛋白質は、細胞質または包接体中に残留する。該蛋白質を遊離するために、該外部膜を破壊することが必要である。これは、好ましくは超音波処理またはフレンチプレッシャーセルもしくは Gaulin ホモジナイザー等の機械的破碎手段により行なわれる。

細胞破壊は、化学的または酵素的手段によって行なえる。細胞膜の完全性のためには普通、2価の陽イオンが要求されるので、EDTAまたはEGTA等の適当なキレート化剤による処理は、細胞からの該蛋白質の漏出を促進するために十分に破壊的である。同様に、リゾチーム等の酵素類が同様な

れる。

本発明の該蛋白質またはその断片は、全固相合成、部分固相合成、断片縮合または古典的液相合成等の好適な方法により、化学的に合成することもできる。Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963)) により記述されている固相合成法が好ましい。

このような合成は、アルファアミノ末端が保護されたアミノ酸を用いて行なわれる。不安定な側鎖を有する三官能性アミノ酸も、ペプチドの組み上げ時にその部位において化学反応が起こることを避けるような適当な保護基により保護される。該アルファアミノ保護基は、該アミノ末端において続く反応が行なわれるように選択的に除去される。該アルファアミノ保護基の脱離条件は、側鎖保護基の脱保護を引き起こさない。

該アルファアミノ保護基は、段階的ペプチド合成の分野で有用な公知のものである。アクリル型保護基 (例えばホルミル、トリフルオロアセチル、アセチル)、芳香族性ウレタン型保護基 (例

結果を達成するために使用されている。その酵素は、該細胞壁のペプチドグルカン骨格を加水分解する。

浸透圧的衝撃の適用もまた使用され得る。これは、概略的には第1に該細胞を高張溶液中に置き、それらの水を失なわせて収縮せしめることにより行ない得る。引続き、低張の“衝撃”溶液中に置くことによって、所望の蛋白質の排除を伴う該細胞中への水の急速な流入が導かれる。

一旦、該細胞から遊離された後、該アイメリア蛋白質は、硫酸ナトリウムまたはアンモニウム等の塩による沈殿、限外口過またはこの分野でよく知られた他の方法によって濃縮され得る。更なる精製は、限定されるものではないが、ゲル口過、イオン交換クロマトグラフィー、調製用ディスクーゲルまたはカーテン電気泳動、等電的フォーカシング、低温度有機溶媒分画、または逆流分配を含む通常の蛋白質精製技術により行ない得る。しかしながら、精製は、後述するように免疫アフィニティークロマトグラフィーにより好適に実施さ

えばベンジルオキシカルボニル (Cbz) および置換ベンジルオキシカルボニル)、脂肪族性ウレタン保護基 (例えば、*t*-ブチルオキシカルボニル (Boc)、イソプロピルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル) ならびにアルキル型保護基 (例えば、ベンジル、トリフェニルメチル) が含まれる。好適な保護基は、Boc である。Tyr のための側鎖保護基は、テトラヒドロピラニル、*tert*-ブチル、トリチル、ベンジル、Cbz、4-Br-Cbz および 2,6-ジクロロベンジルを含む。Tyr のための好ましい側鎖保護基は、2,6-ジクロロベンジルである。Asp のための側鎖保護基は、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル、メチル、エチルおよびシクロヘキシルを含む。Asp のための好ましい側鎖保護基は、シクロヘキシルである。Thr および Ser のための側鎖保護基は、アセチル、ベンゾイル、トリチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、2,6-ジクロロベンジルおよび Cbz を含む。Thr および Ser のための好ましい側鎖保護基は、ベンジルである。Arg のための側鎖保護基

は、ニトロ、Tos、Cbz、アグマンチルオキシカルボニルまたはBocを含む。Argのための好ましい保護基は、Tosである。Lysの側鎖アミノ基は、Cbz、2-Cl-Cbz、TosまたはBocにより保護されてよい。2-Cl-Cbzが、Lysの好ましい保護基である。側鎖保護基の選択は、以下に基づく：側鎖保護基は、カップリング中には元のまま残り、かつ、アミノ末端保護基の脱保護の間およびカップリング条件において分離しない。該側鎖保護基は、最終ペプチドの合成の完成にあたって、目的ペプチドを変化させない条件を使用して脱離可能でなければならない。

固相合成は、通常、アルファアミノ保護（側鎖保護）アミノ酸を適当な固体支持体に結合することにより、カルボキシ末端から行なわれる。クロロメチル化またはヒドロキシメチル化樹脂に対して固定がなされた場合は、エステル結合が形成され、得られる目的ペプチドは、C-末端に遊離のカルボキシル基を有するであろう。別法として、ベンズヒドリルアミンまたはp-メチルベンズヒ

ドリルアミン樹脂が使用された場合、アミド結合が形成され、得られる目的ペプチドは、C-末端にカルボキシアミド基を有するであろう。これらの樹脂は、商業的に入手可能であり、それらの調製は、Stewartらの“Solid Phase Peptide Synthesis”（第2版、Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984）により記述されている。

側鎖においてTosにより保護され、アルファアミノ官能基においてBocにより保護されたC-末端アミノ酸Argは、ベンズヒドリルアミン樹脂に対してジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミドおよびカルボニルジイミダゾールを含む種々の活性化剤を用いて連結される。樹脂支持体への固定に続き、アルファアミノ保護基が、トリフルオロ酢酸(TFA)またはジオキササン中のHClを用いて0℃と25℃との間の温度で除去される。ジメチルスルフィドがメチオニン(Met)の導入後に起こり得るS-アルキル化を抑制するために、TFAに添加される。アルファアミノ保護基の除去の後に、残りの保護さ

れたアミノ酸が所望のペプチド配列が得られるように必要な順序をもって段階的に結合される。

DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス（ジメチルアミノ）-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)およびDCC-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)を含む種々の活性化剤が結合反応のために使用され得る。各々の保護アミノ酸が過剰量(>2.5当量)をもって使用され、そして通常は該結合反応は、DMF、CH₂Cl₂またはそれらの混合物中で行なわれる。該結合反応の完了の程度は、KaiserらのAnal. Biochem., 34: 595(1979)により記述されているようにニンヒドリン反応によって各段階で監視される。不完全な結合が検出された場合には、該結合反応は繰り返される。該結合反応は、Vega250、Applied Biosystems Synthesizerまたは他の商業的に入手可能な装置において自動的に行なうことができる。目的ペプチドの全体の組立て後に、該ペプチド樹脂は、TFA/ジチオエタンを用いて脱保護され、

次いで該ペプチドを樹脂から開裂させると共にすべての側鎖保護基を脱離させる液体HP等の試薬により1-2時間、0℃にて開裂される。

固体支持体上での側鎖と側鎖との間の閉環は、酸性アミノ酸類（例えば、Asp）および塩基性アミノ酸類（例えば、Lys）の側鎖官能基類の選択的な開裂を可能とする直交保護機構(orthogonal protection scheme)を必要とする。この目的のためには、Aspの側鎖に対しての9-フルオールエニルメチル(OPn)保護、および、Lysの側鎖に対しての9-フルオールエニルメトキシカルボニル(Fmoc)保護基が使用できる。これらの場合においては、Boc-保護ペプチド樹脂の側鎖保護基は、DMF中においてピペリジンを用いて選択的に除去される。固体支持体上での環化は、DCC、DCC/HOBtまたはBOPを含む種々の活性化剤を使用して達成される。HF反応は、上述したように閉環したペプチド樹脂上で行なわれる。

合成蛋白質の精製は、組換え的に製造された蛋白質について上述したのと同様に行なわれる。

アイメリア蛋白質類は、*E. tenella* または他のアイメリア種由来の膜蛋白質の抽出物から免疫沈澱または免疫アフィニティークロマトグラフィーによって回収されることも可能である。既に記したように、このような方法では、完全な天然型蛋白質の製造が可能である。ある場合には、これらの蛋白質は、組換えDNA法により製造された蛋白質より大きい。この目的のためのモノクローナル抗体類は、上述したように合成または天然アイメリア蛋白質類を抗原として使用して製造することができる。

必要な免疫反応性および/または抗原性の決定因子を有する他の有用な蛋白質類は、本発明の蛋白質類上の活性決定因子または決定因子類に対して抗-イデオタイプ的な抗体類またはその断片である。このような抗-イデオタイプ的な抗体類は、本発明の蛋白質上の決定因子類に対して特異的な他の抗体類に対して生じされ得る（すなわち、該抗-イデオタイプ的な抗体類は、抗-抗体である）。好ましく、はモノクローナル抗-イデオ

アルミニウムモノステアレートを含む）；水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびミョウバン等の鉱物ゲル；ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リゾレシチン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド、N,N'-ジオクタデシル-N',N'-ビス（2-ヒドロキシメチル）プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびブロン酸ポリオール等の界面活性剤；ビラン、硫酸デキストラン、ポリIC、ポリアクリル酸およびカルボボール等の多価陰イオン類；ムラミルジペプチド、ジメチルグリシンおよびタフトシン等のペプチド類；ならびに油懸濁物を含む。該蛋白質類は、リポゾームまたは他の微少担体への取込後に投与することもできる。

リポゾームまたは他の微少担体への取込は、これによってワクチン類の放出が長期間に亘って維持され得る手段を提供する。Alzaポンプ等のポンプは、同様の目的のために使用され得る。

本発明の蛋白質、特により小さい断片の免疫原性は、交差結合、または免疫原性担体分子（すな

わち、タイプの抗体類が使用される。このような抗体類は、該アイメリア蛋白質類自体が使用され得ると同様な方法において、ワクチンとして投与され得る。

本発明の1種またはそれ以上の該アイメリア蛋白質類および抗-イデオタイプ的な抗体類は、該蛋白質類および生理学的に許容される担体を含むワクチン類として製剤化され得る。好適な担体は、例えば0.01から0.1Mの中性pHのリン酸緩衝剤または生理的食塩溶液を含む。

コクジウム症に対する増強された免疫は、2種類のものの1つにより作られ得る。第1には、アジュバントまたは免疫増強剤がワクチンに対して添加され得る。第2には、本発明の蛋白質類は、免疫されるべき動物に対して交差結合複合体として、または担体分子に結合されたより大きい形態をもって提示され得る。

動物のワクチン接種のための好適なアジュバントは、限定されるものではないが、アジュバント65（ビーナッツ油、マンニドモノオレートおよび

わち、本発明の蛋白質または蛋白質断片を共有的に結合することができ、独立して宿主動物中に免疫応答を誘発する性質を有する巨大分子）に対して結合することにより増強され得る。小さい蛋白質断片は、しばしばハプテン（抗体に対して特異的に結合することができるが、抗体の産生を誘発できない、すなわち免疫原性でない）として挙動するため、交差結合、または担体分子への結合が必要となることもある。このような断片の免疫原性担体分子への結合は、“担体効果”として通常知られていることのために、該断片が免疫原性となる。

好適な担体分子は、例えば蛋白質類およびポリペプチド、多糖類、リポ多糖類等の天然または合成の高分子化合物を含む。有用な担体は、GuilAと称されるグリコシドであって、これらMoreinらのNature 308:457(1984)に記述されている。蛋白質担体分子は、特に好適であって、限定されるものではないが、キーホールリンベットのヘモシアニン、ヒトもしくはウシガンマグロブリン、ヒ

ト、ウシもしくはウサギ血清アルブミン、またはこのような蛋白質類のメチル化もしくは他の誘導体を含む。他の蛋白質担体類は、当業者には自明であろう。必須ではないが、好ましくは、該蛋白質担体は、アイメリア蛋白質類に対する抗体が誘発される宿主動物に対して外来性であるだろう。

担体分子に対する共有的結合は、この分野において良く知られた方法を用いて行なうことができ、その正確な選択は、使用される担体分子の性質により要件が書かれる。該免疫原性担体分子が蛋白質である場合には、本発明の蛋白質または断片は、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドまたはグルタルアルデヒド等の水溶性カルボジイミド類を用いて結合され得る。

これらのような結合剤は、別の担体分子を使用することなく、蛋白質類および断片類それら自体を交差結合するためにも使用することができる。このような蛋白質または蛋白質断片羣集体への交差結合も、また、免疫原性を増大することができる。

にクローン化し、そして該生ベクター系を鳥類に経口的、注射により、または他の通常使用されている経路により投与することにより達成できる。Carbitら (Vaccines, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory, 68-71 中) は、*E. coli* の使用を記述し、一方、Clements (Pathol. Immunopathol. Res. 6:137 (1987)) は、*Salmonella* の使用を記述した。Mossら (Ann. Rev. Immunol. 5:305 (1987)) は、組換えボックスウイルス (poxvirus) を使用したウイルスベクター系の使用を評論している。

ボックスウイルスの一種であるワクシニアウイルス (*vaccinia virus*) は、細胞培養物中および動物中でコクシジア抗原の放出の試験のために使用し得る。分析的な研究のために、ワクシニアウイルスは、使用し得る他のボックスウイルス担体である fowlpox virus よりも効果的であることが見出された。これは、ワクシニアウイルスが鳥類のウイルスより急速に複製され、かつニワトリ細胞に限定されない宿主範囲を有するためである。大量の異種 DNA が、ウイルスの成熟および感染力を

本発明のワクチン類の有効量の投与は、*E. tenella* による感染に対して家禽を保護し得る。*E. tenella* 抗原に対するモノクローナル抗体類は、インビトロにおいて *E. acervulin* および *E. maxima* と交差反応し、これらの種に対する保護も与えられるであろうことを示している。該蛋白質または蛋白質断片の有効な投与量は、ワクチン接種される動物の体重において、約10から約50マイクログラム/kgの範囲を有する。約25-50 μg /kgの投与量が好ましい。最初のワクチン接種は、好ましくは、1ないし数週間後に与えられる増進用ワクチン接種に引き継がれる。複数回の追加が投与されてもよい。このような追加の投与量は、一般的には約5から50 μg /kg、好ましくは約20-50 μg /kgである。皮下、皮内、筋内、経口、肛門または卵内投与等の標準的投与経路が使用できる。

鳥類の免疫系に対する本発明のコクシジア抗原の提示は、該抗原をコードする遺伝子を細菌 (例えば *E. coli* または *Salmonella*) 中、またはウイルス (例えば poxvirus または herpesvirus) 中

阻害することなしにワクシニアウイルスのゲノム中に挿入され得る [SmithらのGene 25:21 (1983)]。ウイルスを使用した多重異種遺伝子の挿入および発現は、感染を受けた動物中に発現された抗原に対する抗体の産生を誘発する (PerkusらのScience 229:981 (1985))。

組換えワクシニアウイルスの製造のために用いた技術は、fowlpox または herpesvirus 系に対する一定の処理手続に容易に適合させることができる。このような組換えウイルスのコクシジウム症に対するワクチン中の担体としての使用は、ワクチン接種された鳥類がコクシジア抗原およびウイルス担体の両者に対して免疫を発生する (すなわち、このようなワクチン類は、二価である) 点において特に優れている。このようなワクチン類の有用性は、付加的な遺伝子類を担体ウイルス中に挿入することにより、更に増強され得る。得え、ニューカッスル病ウイルスゲノムの部分がコクシジア抗原遺伝子と共に fowlpox virus 中に挿入され得、これによりニューカッスル病、コクシジウ

ム症および鶏痘のすべてに対して単一のワクチンにより免疫が与えられる。

本発明の生ベクターワクチンの投与は、この分野でよく知られた多くの方法により行なうことができる。例えば、鶏痘ウイルスに対して家禽にワクチン接種するために通常使用されている“突きさし”法が使用される。この方法は、ワクチン中に浸された鋭い針により、翼の羽の皮膚を突くまたは刺すことからなる。この針は、通常ミシン針のように先端近くに目を有し、これによりワクチンの滴を運ぶ。別法として、該生ワクチンは、翼の羽または他の部位に皮下的または皮内的に注射することができる。

核組換え生ベクターワクチンは、飲料水中に添加されてもよく、またワクチン接種される鳥に噴霧することもできる。それらは、飼料中において、好ましくは保護的なカプセル化の後に〔BalancouらのNature 322:373(1986)〕、または卵内的に投与することもできる。後者の方法においては、ウイルスワクチンは、直接的に鶏胚中に注射される

シン、ヒナ鶏胆汁含有pH 8のハンクス氏塩溶液に再懸濁され、40℃で2時間インキュベートされた。切除溶液は、10%牛胎児血清(PBS)を含有するRPMI-1640培地で2度洗浄し、pH7.4のPBSで2度洗浄することで除去された。

次に、スポロゾイドは、次にメトラジミドのグラジエント(勾配)により精製された。〔ウィッシャー(wisher)他、パラジトロジー 88巻 P.515(1984)〕。簡単に述べるとスポロゾイドは、pH7.0のPBS 2mlに再懸濁され、懸濁液1mlが15mlのメトリザミドのグラジエントに重層された。グラジエントは、12%、18%、24%のメトラジミド含有PBS、pH7.0、それぞれ5mlからなっている。スポロゾイトは900×g 40分間の遠心分離により沈降される。精製されたスポロゾイトは、21ゲージの針をチューブの側面を通して18%と24%のメトリザミド間の界面へ挿入し、注射器へスポロゾイトを吸引することにより分離された。精製されたスポロゾイトはpH7.0のPBSで3度洗浄され、直ちに免疫、感染研究、¹²⁵Iによる表面ラベル、蛍

(SharmaのArian Dis. 25:1155(1985))。

実施例

別途特定しない限り、以下では、固体混合物中の固体のパーセントは wt/wt(重量/重量)、液体中の液体のパーセントは vol/vol(容量/容量)、液体中の固体のパーセントは wt/vol(重量/容量)をそれぞれ基準とする。

1. アイメリア抗原に対するモノクローナル抗体の調製

1.1 宿主調製

E. テネラ(E. tenella), E. アセルブリナ(E. acervulina), E. ブルネッティ(E. Brunetti), 及びE. マキシマ(E. Maxima)のスポロゾイトが通常の方法で孢子形成した接合子囊(sporulated oocyte)から単離された。簡単に述べると、孢子形成した接合子囊は蒸留水及び20%漂白剤で洗浄し、そして、蒸留水で洗浄される。接合子囊は組織ホモジェナイザーで破壊され、スポロシストを含む不溶材料は遠心分離により回収された。沈降中の放出されたスポロシスト及び他の材料は0.25%トリブ

光免疫分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Laemmli, Nature 227:680(1970))及びウェスタンブロッティング研究に使用された。

E. テネラ(E. tenella)のメロゾイトは以下6.2.3節に記載されるように分離された。精製されたメロゾイトは免疫に用いられ、そして、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウェスタンブロッティング研究用のLaemmli 試料緩衝液で可溶化された。

1.2 免疫

以下のスケジュールにしたがい、精製された生存スポロゾイトで8匹のメスの Balb/c マウス(Charles River, Wilmington, Mass)が免疫された。

- | | | |
|-------|------------------------|--------------|
| 1日目 | 1×10^7 スポロゾイト | 静脈注射(i.v.) |
| 7日目 | 6×10^7 スポロゾイト | 腹腔腔内注射(i.p.) |
| 85日目 | 6×10^6 スポロゾイト | i.p. |
| 120日目 | 3×10^7 スポロゾイト | i.p. |
| 244日目 | 融合前 免疫促進剤(ブースター) | |
| 1日目 | 5×10^6 スポロゾイト | i.v. |
| | 5×10^6 スポロゾイト | i.p. |

2日目 1日目と同じ

5日目 過免疫脾臓細胞とミエローマ細胞との融合

各々のマウスからの血清は、抗スボロゾイト抗体について、精製スボロゾイト蛋白質を用いてELISAにより、可溶化スボロゾイト蛋白質を用いてウェスタンブロッティングアッセイにより、 ^{125}I でラベルされたスボロゾイト表面蛋白質の免疫沈澱により、そして、精製スボロゾイトを用いる免疫蛍光分析によりテストされた。もっとも高いスボロゾイト抗体反応性を示したマウス（マウス107-2）が融合前免疫ブースターに選ばれた（この抗血清のELISA分析に関し、図1参照）。5日目に当該マウスは屠殺され、脾臓細胞調製のため脾臓が取り除かれた。

1.3 細胞培養及び細胞融合

融合2日前に、脾臓細胞のフィーダー細胞が純粋なマウスから完全増地（イソコフの修正ダルベッコ増地（IMDM, Gibco）に10% FBS, グルタミン（2.0mM）及び2-メルカプトエタノール（100 μM ）

いELISAにより、スボロゾイト蛋白質を用いウェスタンブロッティングにより、 ^{125}I ラベルされたスボロゾイト表面蛋白質を用い免疫沈降法により、及び精製スボロゾイト及びスボロゾイト感染細胞を用い免疫蛍光により抗スボロゾイト抗体が分析（アッセイ）された。ハイブリドーマは限界希釈によりクローン化された。

1.4 スボロゾイト ELISA

あらかじめ1% BSA含有 pH7.0、PBS でブロックされた96穴 U-底 PVCプレートの各穴に精製されたスボロゾイト（ 4×10^4 ）が加えられた。スボロゾイトは5分間1000 $\times g$ の遠心分離で穴の底へ沈降された。スボロゾイトは100 μl の希釈抗血清又はハイブリドーマ上清中に再懸濁され、連続かく押しながら室温で2時間培養された。

スボロゾイトへ結合した特異的抗体の検出のためにパーオキシダーゼ結合した抗-マウス（IgG）ヤギIgGが再懸濁されたスボロゾイトへ添加され、懸濁液は室温で2時間培養された。スボロゾイトは洗浄され、結合した抗体は、基質溶液（オーフ

を加えたもの）及びHAT（100 μM ヒポキサン、10 μM アミノプテリン、及び16 μM キミジン）中に調製された。de st Groth他の方法（J. Immunol. Methods 35:1(1980)）の変法により、 10^6 コ脾臓細胞が 10^6 個のPAI-0マウスミエローマ細胞と融合された。ハイブリドーマの調製に好適ないかなる他のミエローマ細胞をも用い得る。多くのそのようなミエローマ細胞は公知であり、当業者に入手可能である。

細胞は混合され、遠心分離により沈澱され、1 mlの35% (vol/vol) ポリエチレングリコールを含むIMDMに37℃で1分間ゆっくりかく押し続け、再懸濁された。

37℃で3分間の培養後、上記細胞は再度沈澱させられ10 mlのIMDM+HAT にゆっくり再懸濁された。細胞は次に 1×10^6 細胞/mlになるように完全増地+HAT 中へ希釈され、1 mlの完全増地に 5×10^4 脾臓フィーダー細胞を含有する24穴マイクロタイタープレート（1 ml/穴）へ分散された。

ハイブリドーマ上清は、精製スボロゾイトを用

ユニレネジアミン 0.4mg/ml含有 0.1M クエン酸緩衝液、0.12%過酸化水素）を添加、室温30分で可視化された。反応は、50mMメタビスルファイトナトリウム含有 2.5M H_2SO_4 を添加することで停止された。結合抗体量は基質呈色のOD₄₉₂の読み取りにより決定された。

細胞融合から培養された合計480のウエル（穴）の内、432がハイブリドーマ成長に陽性であった。この内、358のハイブリドーマが一次スボロゾイトELISAにおいて抗体酸性が陽性であった。これらのもとの親ハイブリドーマ細胞の増殖及び継代中に、104の細胞は死滅するか、抗体産生を停止し、したがって、その後のスボロゾイトELISA及びウェスタンブロットアッセイによるスクリーニングでは陰性であった。スボロゾイトELISAにより10 \times バックグラウンドレベルで抗体を産している205のハイブリドーマが同定された。

1.5 スボロゾイト蛋白質のウェスタンブロッティング

精製されたスボロゾイト（約 5×10^7 スボロゾ

イト μ l/gel)がLaemmli の試料緩衝液に可溶化され、12.5%ゲルまたは、7.5 から20%の勾配ゲル(Laemmli, supra)を用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、分離され、電気泳動的にニトロセルロースシートへ移された。該シートは30%ゼラチンバッファー(3%ゼラチン, Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl)でブロックされ細片に切断され、細片は希釈抗血清又はハイブリドーマ上清と12時間4℃で1% BSA緩衝液(1% BSA, 50mM リン酸ナトリウム pH6.5, 0.5M NaCl, 0.05% Tween-20)中で反応させられた。細片は pH7.4, 0.05% Tween-20 PBS 中で洗浄され、特異的結合抗体は、パーオキシダーゼ結合抗マウス抗体により検出された。結合抗体は基質溶液[4-chloro-1-naphthol (10mlの水混メタノール及び50mlのTris-HCl pH7.5中に30mg溶解された)、0.15M NaCl, 0.015%最終濃度 H_2O_2]を添加室温で30分で可視化された。反応は蒸留水で過度に洗浄することで終結された。スポロゾイトELISAにおいて陽性であった抗体のうち、可溶化スポロゾイト蛋

白質で用いるウェスタンブロット分析によっても160が陽性であった。

ウェスタンブロット分析(第2図参照)により、モノクローナル抗体は3種類の反応性(a)単一のアイメリア蛋白質(例、IIA1及びIID1)に結合するもの、(b)2又は3の蛋白質(例、6A5及び20C6)に結合するもの、及び(c)多数の蛋白質(例、IIA5, 13A6及び14B5)に結合するもの、の一つにあてはまることが示された。

抗体は、更にE.テネラメロゾイト及びE.アセルブリナのスポロゾイト蛋白質を用いるウェスタンブロット分析により特徴づけられた(第3図)。3A5, 13A6, 7D1, 及び20C6を含む多数の抗体はE.テネラ及びE.マセルブリナのスポロゾイトから単離された蛋白質及びE.テネラのメロゾイトから単離された蛋白質を認識した。6A5のような他の抗体は種及び段階特異的であり、E.テネラのスポロゾイトにのみ結合することが示された。

いくつかの抗体について得られた結果の要約が第1表に示されており、抗体の特異性は(a)抗体が

結合するゲル中の蛋白質の起源及びサイズ、及び(b)抗体で沈降された ^{125}I -ラベルされたアイメリアテネラ蛋白質の大きさの両者で示された(右欄)。抗体は更にアイソタイプにより表中で特徴づけられた。

(本頁以下余白)

第 1 表
ウェスタンブロット分析

アイメリア蛋白質(gel size in kd)						蛋白質の	
抗体	アイソタイプ	Tenella		Acervulina		Maxima	大きさ
		Spz	Mrz	Spz	Spz	(kd)	
7B2	G _{2a}	>200	-	-	-	-	
7D4	G ₁	120	120	120	-	110	
7D1	G ₁	120	120	120	N.D.	110	
20C6	G ₁	120	120	120	N.D.	110	
3A5	M	120	120	120	17	120	
19D6	G ₂	180	180	-	-	120	
8A2	G _{2a}	37	37	-	-	37	
6A5	G _{2b}	28/26	-	-	-	25	
14B5	N.D.	>150	N.D.	-	-	N.D.	
15B3	N.D.	>150	N.D.	-	-	N.D.	
14B1	G ₂	6	6	-	-	24/17	
12B2	G ₂	28/26	-	-	-	24/17	
15A3	G ₁	28/6	-	-	-	17/15/6	
15A4	M	28/26	-	-	-	105/15/6	
12C3	G ₂	28	-	N.D.	N.D.	25	
5B6	G ₂	-	N.D.	-	-	6	
3C4	M	"	"	"	-	70	
16D2	M	"	"	"	-	70/85	
13A6	M	"	"	"	-	110	
11B6	G ₂	"	"	"	-	105	
12A3	G ₂	"	"	"	-	24/17	
12D4	G ₁	"	N.D.	-	-	N.D.	

- ・ Spz 及び Mrz は、それぞれスボロゾイト及びメロゾイトの略号である。
 - ・ G 及び M は、それぞれ IgG 及び IgM を示す。
 - ・ n は、24~200kd 以上のサイズの範囲の複数の蛋白質と抗体が結合することを示す。
 - ・ N.D で示される価は決定（定量）されなかった。
- 1.6 ¹²⁵I-ラベルされたスボロゾイト表面蛋白質

質の免疫沈降

精製されたスボロゾイトの表面蛋白質は IODOGEN 法 (Pierce Chemical 社) 又は IODOBEADS (Pierce Chemical 社) を用いて ¹²⁵I でラベルされた。後者の手法の場合、4つの IODOBEADS は、pH7.5 0.2M のリン酸ナトリウム溶液で3度洗浄され、1-3mCi の ¹²⁵I-Na が添加され、室温で5分間培養された。精製されたスボロゾイト (3×10^8) を含む 200 μ l の PBS pH7.0 が反応バイアルへ添加され、培養は15分間続けられた。培養終了時にフェニルメタンスルフォニルフルオリド (PHSP) が最終濃度 0.5 mM になるように添加された。

スボロゾイトは $12,000 \times g$ 30秒の遠心分離によ

り培養混合液から回収され、2% SDS 又は 1% Triton X-100 を含む pH7.0 PBS 中で可溶化された。不溶成分は $12,000 \times g$ 3分間の遠心分離により除去され、該可溶化スボロゾイト蛋白質は 3 μ l の pH7.0 PBA に対し 4 $^{\circ}$ C でカットオフ分子量 3500 の (透析) 膜を用いて残留自由 ¹²⁵I を除去するために透析された。

¹²⁵I-ラベルされたスボロゾイト蛋白質 (典型的には 1.5×10^5 cpm が蛋白質にとり込まれている) は使用時まで 4 $^{\circ}$ C で貯蔵された。TCA で沈降可能な放射能は典型的には全放射能の 95% を超えていた。¹²⁵I でラベルされたスボロゾイト蛋白質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析が図 4 左部分に示されている。

免疫沈降は、300 μ l のハイブリドーマ上清又は希釈抗血清を 250 μ l の ¹²⁵I でラベルされたスボロゾイト蛋白質 (1×10^5 cpm) を含有する Buffer I (0.25% NP-40, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl) に添加することで行なわれた。4 $^{\circ}$ C で16時間培養後、アガロース (Sigma Chemical 社) にカ

ップリングされた抗マウス ヤギ IgG の 50% 懸濁液 100 μ l - 200 μ l が添加され、混合液は室温で2時間回転ミキサーで培養された。ビーズは $12,000 \times g$ で1分間遠心分離して沈降され、洗浄バッファー (0.1% SDS, 0.5% NP-40, 0.2% デオキシコール酸ナトリウム, 10mM PHSP, 10mM Tris-HCl, pH8.5, 0.15M NaCl) で3度洗浄された。

固相抗体に結合した ¹²⁵I-ラベル蛋白質ははずされ、2 \times Laemmli 試料緩衝液を 60 μ l 添加し、95 $^{\circ}$ C で3分間加熱することにより変性された。免疫沈降させられた ¹²⁵I-ラベルされたスボロゾイト蛋白質は 12.5% ゲル中での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離され、オートラジオグラフィにより可視化された。

免疫マウス血清を用いた免疫沈降アッセイの結果は図 4 右欄に示されている。スボロゾイト ELISA で陽性であったハイブリドーマ抗体のうち、74 が免疫沈降によっても陽性であった。第 5 図に示されたようにハイブリドーマ抗体は 2つのカテゴリー、すなわち一つの蛋白質を沈降させるもの (例、

3C4.6A5, 7D4, 8A2, 11D2 及び 20C6)、及び 2 以上の蛋白質を沈降させるもの (例、12B2, 15A3, 15C4 及び 19D6) にあてはまる。

1.7 精製スボロゾイトを用いる免疫蛍光分析

pH7.0 PBS 中の 8 室あるスライドガラスにスボロゾイト (1×10^5) が添加され、37 $^{\circ}$ C で12時間空気乾燥された。スライドは 10% 正常ヤギ血清を用い 2 時間、37 $^{\circ}$ C でブロックされた。希釈された抗血清又はハイブリドーマ上清が各々の室 (チャンバー) へ添加され室温で2時間培養された。スライドは洗浄され、ローグミンの結合した抗マウス抗体 (PBS pH7.0, 0.3% Triton X-100 で希釈) が室温で1時間添加された。スライドを洗浄後、結合抗体は蛍光で可視化された。

抗体の大部分は表面膜及び/又は空気乾燥されたスボロゾイトの屈折体 (refractile body) に対して特異的免疫蛍光を示した。ある抗体はスボロゾイトの頂部末端 (apical tip) を強く染色し、残りのスボロゾイト表面は (第 6 図、パネル C) はわずかに染色した。

空気乾燥した精製スプロゾイトは図6、パネルA、B、C及びDの左側スライドに示されている。精製スプロゾイトは元通りであり、伸長しており、優性後部大屈折体(PRB)及び前部小屈折体(ARB)を示した。そのスプロゾイト頂部端(A)は、後部屈折体の反対側にあった。完全スプロシスト(パネルB、左側)及び破壊スプロシスト膜により調製物は若干コンタシ(汚染)されていた。

1.8 ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降及び免疫蛍光の結果のサマリー

55のモノクローナル抗体の上記分析から生じた結果のサマリーが第2表に示されている。

(本頁以下余白)

第 2 表 (1) モノクローナル抗体の分析 ウェスタンブロット						
抗体	E. tenella Spz. ^a	Low Spz. ^b	E. acervulina Spz. ^c	E. tenella Mz. ^d	IFA ^e	免疫沈降 ^f
3C4	M ¹				-	60-80
1185	M ¹	+	+	+	1,2,4	105
12A5	M ¹	-	-	-	1	-
14D4	M ¹	+	+	+	1,3,4	66
15B6	M ¹				1,4,7	20-24
17A5	M ¹		+	+	1	150/83
18B6	M ¹	+	+	+	-	25/20, 66/60
19C6	M ¹	+	+	+	1,2	25/20
20A2	M ¹	+	+	+	5	66/60
20B4	M ¹	+	+	+	1,4	86/60
11C4	M ²		+	-	1,6	-
12A3	M ²	-	-	-	1,4,7	22/24
13A6	M ²	+	+	+	1,5	110
14B6	M ²				1,4,7	150-120
14D1	M ²				-	120
9B2	M ³	+	+	+	5	66/45
12B1	M ³	+	-	-	6	26-28
14C5	M ³	-	-	-	-	105
15C4	M ³	+	-	-	6	105
16D2	M ³				-	60-80
20C3	M ³	+	+	+	3	14-17
3A5	120	+	+	+	3	-
6A4	120				-	-
7D1	120		+	+	1,2,4	110
7D4	120		+	+	5,1	110
10A6	120	+	-	-	1,2,6	105
11D2	120	-	-	-	4,1,2	105
14A1	120	-	-	-	6,1	110
17B6	120	-	-	-	1,6,7	120
17C6	120		-	-	8,1	105
19D6	120	+	-	+	3	120
20C6	120	+	+	+	1,2	110

第 2 表 (2)
モノクローナル抗体の分析
ウェスタンブロット

抗体	<i>E. tenella</i> Spz. ^a	Low Spz. ^b	<i>E. acervulina</i> Spz. ^c	<i>E. tenella</i> Mz. ^d	IFA ^e	免疫沈降 ^f
10A5	>150	-	-	-	7.5	105
11A6	>150	-	-	-	3	-
7B2	>200	+	-	-	-	>200
11B1	>150, 200	-	-	-	1.7, 6	27
11D4	120/24	+	-	-	1	27
11D6	120/24	+	-	-	2	-
12C3	120/24	+	-	-	1.8, 2	25
15B2	120/24	+	+	+	3	-
15A3	90/10-14	+	-	-	1.6	28/14-17
14C3	60	-	-	-	1.4	6
14A5	120/6	-	-	-	1.3, 6	6
8A2	37	+	+	-	1.4	37
6A5	28, 10-14	+	-	-	1.6	25-28
11A1	24	+	-	-	1.6	-
11C1	24	+	-	-	-	-
12B2	24	+	-	-	1.5	24/120
12C6	24	+	-	-	-	-
16B1	24	+	-	-	1.4	6/14-17
18D5	24	+	-	-	1.6	48/25/6
20C6	24	-	-	-	1.3	5/14-17
14B1	< 6	+	-	-	1.6	20-24
10A2	-	-	-	-	1.2, 4	6/105
5B6	-	-	-	-	1.6	6/17/15

- a. 示される価は、ウェスタンブロッティングで、抗体により認識される*E. テネラス*ポロゾイト蛋白質又は、40-150kd(M¹)、120及び80-150kd(M²)並びに25及び40-150kd(M³)の分子量を持つ認識された蛋白質群の分子量である。
- b. ウェスタンブロットアッセイは、通常の*E. テネラス*ポロゾイト蛋白質の1/5で行なわれた。したがって、陽性反応を示す抗体は、高親和性を有している。
- c. ウェスタンブロット反応性は、*E. アセルブリナス*ポロゾイト蛋白質に対して示されている。
- d. ウェスタンブロット反応性は、*E. テネラ*メロゾイト蛋白質に対して示されている。
- e. 免疫蛍光分析(IFA)染色のパターンの結果は、空気乾燥*E. テネラス*ポロゾイトの間接分析として(1)表面、(2)頂部、(3)パッチ表面、(4)ブライト表面、(5)ライト表面、(6)拡散表面、(7)屈折体及び(8)パンクテート染色として要約されている。
- f. 免疫沈降において抗体により捕えられた¹²⁵I-ラベルされた*E. テネラス*ポロゾイト蛋白質の分

子量が表示されている。

好適なモノクローナル抗体 7D4, 7D1, 20C6, 8A2, 6A5 及び7B2, はこれらのモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの形で ATCC 12301 Parklawn Drive, Rockville Maryland プタベスト条約上の寄託をされ、それぞれ寄託番号は HB 97 07, HB 9708, HB 9709, HB 9710, HB 9711, 及び HB 9712 である。

1.9 インビトロ感染アッセイ

一次鶏ジン臓上皮細胞がDoran等のJ. Protozool 25:544(1978)の方法に従って樹立された、4-室のLab-Tek Slide で40-50%になるまで培養された MDBK(Madin-Darby bovine kidney)細胞(ATCC-CL 22)がニワトリジン臓上皮細胞のかわりに用いられた。

細胞は50,000又は200,000の精製されたスポロゾイトを接種された。感染16時間目に細胞単層は細胞に侵入しなかったスポロゾイトを除去するため数回洗浄された。感染後3, 16, 24, 48, 64, 96 及び120時間目に100%メタノール(室温で5分間)

で代表的な接種細胞培養物は固定された。固定されたスライドは、上述のように免疫蛍光で現象されるまでpH 7.0、1% BSA含有 PBS中に4℃で保存された。多様な抗体で得られた染色パターンは第7図に示されている。

感染後3時間目と24時間目の間に、固定された培養物は、細胞間にスポロゾイト(第7図、3時間目に7D4及び19時間目に8A2)。その後、スポロゾイトは屈折体のみへ退化した(7D4、60時間)。細胞内スポロゾイトの表面及び頂部端は、7D4抗体(第7図、7D4、3時間目)で明るく染色された。しかしこの抗体は感染された細胞の表面は染色しなかった。

24時間後スポロゾイトは変性し始め、シズント(分裂前体)に发育し、次の48時間でシズントへ成熟した。抗体7D4は変性しているスポロゾイトと反応し続けたが未成熟のシズント(第7図、7D4、60時間)と反応しなかった。しかしながら、シズントが成熟するにつれ、シズント(第7図、7D4、100時間)内の構造物と7D4は反応し始めた。こ

しかしながら抗体7D4及び14B1は寄生虫の发育の大部分の段階と反応するが他の抗体は表面抗原のみ(第7図、15A3)又は細胞内スポロゾイト屈折体と反応し寄生虫のシズント又はメロゾイトの段階とは反応しない。

2つの独特な抗体、8A2及び19D6は感染分析により固定された。8A2抗体は、スポロゾイトの表面(第7図C、8A2、19時間)、发育中のシズントの全ての段階(第7図C、8A2、120時間)及び放出されたメロゾイトの表面(第7図C、8A2、120時間)に存在する37kdの蛋白質と反応する。7D4及び14B1抗体により認識される蛋白質には類似せず、37kd蛋白質は、寄生虫の細胞内での发育期間中合成された。

抗体19D6は18kdスポロゾイト表面抗原蛋白質と反応するのみならず、スポロゾイト感染細胞(第8図、3時間後19D6)の細胞質中の蛋白質とも反応した。19D6抗体により認識された細胞質内蛋白質は細胞感染後スポロゾイトにより出されたものかもしれない。というのは、未成熟シズント发育

これらの構造は、发育中のメロゾイトであり、7D4抗体は成熟と放出されたメロゾイト(第7図、7D4、120時間)の表面抗原と反応し続けた。

このように7D4は、E.テネラスポロゾイト及びメロゾイト上に存在120kd膜抗原と同定した。

この抗原は、未成熟メロゾイトがシズント中で发育するまで寄生虫发育のシズント段階では発現されなかった。

抗体14B1は抗体7D4のそれと類似の反応性パターン、すなわち、細胞内スポロゾイト(第8図、14B1、16時間)の表面及び頂部を染色し、細胞内スポロゾイトの直接近接部における細胞質(サイトプラズム)を拡散染色することを示した。14B1に認識された抗原は、成熟シズント(第8図、14B1、100時間)中の未成熟メロゾイトの頂部及び成熟し放出されたメロゾイトの頂部(第8図、14B1、120時間)に存在する。抗体7D4及び14B1により示される染色パターンは類似している。しかし、これらの抗体が認識する蛋白質はそれぞれ120kdと6kdと非常に異なる分子量を有している。

中には上記蛋白質は消失し、成熟したシズント及び放出されたメロゾイト中に再び現われるからである。

E.テネラの感染を生きのびた、ニワトリからの抗体血清は7D4抗体の染色と同様なパターンで、細胞内スポロゾイトの頂部端及び表面を染色する(第8図B免疫ニワトリ血清、3時間)が、しかし、細胞内スポロゾイトの屈折体は染色しない。

スポロゾイトに感染したニワトリ腎臓細胞を用いる免疫蛍光研究は、(a)スポロゾイト(例えば200kd以上及び28kdの蛋白質でそれぞれ7B2及び6A5により認識されるもの)に特異的で、(b)細胞内寄生虫のすべての段階(例えば8A2により認識される37kd蛋白質)にみられ、そして(c)スポロゾイト及びメロゾイトに特異的であるがシズント(例えば120kd及び6kdの蛋白質でそれぞれ7D4抗体及び14B1抗体により認識されるもの)には特異的ではない抗原と確認された。

1.10 インビトロでのスポロゾイト中和分析

SchnatzらのJ. Protozool 33:109(1986)の方法

の一修正手法において、MDBK細胞はトリプシン処理され、1% FBSを追加した最小限必須培地中に 7.5×10^4 細胞/皿の濃度で懸濁された。マイクロタイタープレートの各々の穴（組織培養処理された96穴）へ 1.5×10^4 の細胞が添加され、40℃で48時間培養された。精製されたスポロゾイトは単層細胞への感染に先立ち、40℃で1時間抗体と前処理されるか、又は未処理で放置された。抗体（組織培養物、腹水又は抗血清のいずれか）は、pH7.0 PBS に対して十分に透析され、56℃30分間熱失活させられ、使用前に除菌濾過された。

感染直後、 $(5, 6) -^3\text{H}$ -ウラシルが最終濃度 $5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ となるように全穴に添加された。感染19時間後、上記培地は除去され、培養物はPBSで一回洗浄された。

上記細胞はトリプシン-EDTAで40℃15分間処理することではがされ、ガラスファイバーフィルター上へ集められた。

上記フィルターは乾燥され、シンチレーション液体 (READY-SOLV® New England Nuclear) 上に

置かれ、結合放射能がカウントされた。抗体のスポロゾイト侵入及び又は発育の阻害能力は、抗体処理されたスポロゾイトで感染された細胞と比較した。未処理スポロゾイトで感染された細胞へ取り込まれた放射能により定量された。

スポロゾイトは、また対照抗体、バッファー又はラサロシド (Iasalosid)、つまり静球虫剤で前処理された。ラサロシドは、MDBK細胞中におけるスポロゾイトの発育を完全に阻止し、 ^3H -ウラシルの取り込みを大きく低下させた。

結果は、第9図に示されている。7D4抗体 (□) 8A2 抗体 (○)、及び14B1抗体 (●) は、感染MDBK培養物への ^3H -ウリジンの取り込みを大きく阻害した。6A5 (■) 抗体あまり有効ではないが、いくらかの阻害を示した。

バッファー (△) 及び対照抗体 (×) で処理では阻害を起こさなかったが、ラサロシド (×) は実質的に完全な阻害を起こした。

2. cDNA発現ライブラリーの作成

2.1 胞子形成した接合子囊の調製

3週令のニワトリ (ヒューバードクロス、アピアンサービスフレンチダウン、ニュージャージー、U.S.A) から、一羽につき、50,000 E.テネラの胞子形成接合子囊で経口接種した後7日目に盲腸が除去され、蒸留水を用いワーリングブレンダー中で1分間ですりつぶされた。

容量は蒸留水で1ℓに調整されペプシン (シグマケミカル Co. セントルイス, ミズリー, U.S.A.) が $3 \text{ g}/\ell$ になるように加えられた。pHは濃塩酸で2.0に調整され、混合物は2～3時間、即ち単一の接合子囊懸濁液が得られるまで、39℃で培養およびかく拌がなされた。消化後、10N NaOHによりpHを8.0に調整し、3ℓの蒸留水を添加した。混合物は沈殿のため一晩放置された。上清は取り除かれ沈殿は上清が透明になるまで洗浄された。接合子囊は室温で蒸留水中で懸濁物に泡だて通気することで胞子形成させられた。胞子形成は、24時間後 RNA調製のために停止された。

2.2 胞子形成接合子囊mRNAの単離

全RNA は、マニアティス (Maniatis et al) ら

の前述文献 p196 に記載された、グアニジニウム/塩化セシウム法の修正法により調製された。接合子囊はPBS (0.15M NaCl, 20mM リン酸ナトリウム, pH7.9) で洗浄され、そして5M グアニジニウムイソチアシアネート, 50mM Tris-HCl, 10mMエチレンジアミンテトラアセテート (EDTA), 0.5% サルコシル (Sarkosyl: N-ラウロイルサルコシナトリウム, シグマケミカル Co.) 及び0.1M β-メルカプトエタノールを含有し、5ℓのアンチフォームA (ユニオンカーバイド, ダンブリー, コネチカット U.S.A.) 又は他の消泡剤が好適には添加された溶液10ℓ中でゆるやかに渦流かく拌を行ない再懸濁された。細胞懸濁液は、顕微鏡で観察した時、接合子囊が良好に破壊されたと見えるまで上記細胞懸濁液はホモゲナイズされた。

不溶細胞断片は低速遠心分離により除去され、ホモジネートは4分面に分けられ、12ℓのポリカーボネート、遠心管中で5.7M CsCl, 0.1M EDTA, pH7.5 の溶液1.2 ℓの上へ重層された。遠心管はベックマン SW 50.1ローター中で4000rpm で15℃

17時間遠心された。上清液体は捨てられ、遠心管壁は乾燥せられ、ペレットは $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテインキナーゼ（ベーリンガー・マンハイム）を添加した、 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), $\text{pH}7.5$ 溶液 1.25ml 中に再懸濁された。37℃で30分間培養後、上記溶液はフェノールで3回抽出された。最終水相中のRNAは、エタノールで3回沈澱せられ、 1ml の水に溶解せられた。

ポリアデニル酸化（ポリ(A)⁺）RNAは、マニアティス (Maniatis) ら前述文献 p197 に記載されたオリゴ(dT)-セルロースカラム（ファルマシアファインケミカル）上で全RNA 2mg を2度通過させて調製された。ポリ(A)⁺ RNAはエタノールで2度沈澱され、水 $200\mu\text{l}$ に溶解された。生成量は 260nm のODから測定された所、約 $26\mu\text{g}$ であった。

2.3 メロゾイトの調製

E. テネラのメロゾイトは、一羽につき50,000の前述胞子形成接合子蠶で感染後5日目に、50匹の感染ニワトリ（3週令、ヒューバードクロス、トリ

ウエスタンブロット分析のために精製された。

DEAEセルロースでの精製のため、約 1×10^8 のメロゾイトがPBS中で10mlのベットの容量のカラムにかけられ、PBSで溶出された。メロゾイトは、最初の100mlの実質的に赤血球や他の細胞破片のない、溶出液中に回収された。

2.4 メロゾイトmRNAの単離

$1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ の個体を含有する冷凍メロゾイトペレットは 1mM のジチオスレイトール(DTT)及び300単位のRNasin（プロメガバイオテック、マジソン、ウィスコンシン、U.S.A.）を含有するTEL/SDSバッファー（ 0.2M Tris-HCl, 0.1M LiCl, 25mM EDTA, 1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), $\text{pH}8.8$) 10ml 中へ溶解され、テフロンコートされた組織ホモゲナイザー中で10-12ストロークでホモゲナイズされた。不溶破片は、冷却下 $3000 \times g$ で遠心分離により分けられた。上清液体はTELバッファーで平衡化されたフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（24:24:1, v/v）で2回で抽出された。

（アピアン）サービスフレンチタウム、NJ）の盲腸から得られた。

盲腸は取り出され、リン酸緩衝塩溶液（PBS）でマグネチックスターラーを用い15分間洗浄された。

上皮破片は、低速度遠心分離により部分的には除去され、粗メロゾイトは $2000 \times g$ 4℃10分間の遠心分離により回収された。沈澱は、溶解バッファー（ $8.29\text{g}/\text{l}$ NH_4Cl , $0.372\text{g}/\text{l}$ Na_2EDTA , $1.0\text{g}/\text{l}$ KCO_3 , $\text{pH}7.6$ ）に再懸濁され、氷上で30分間培養された。

メロゾイトは、遠心分離により回収され、PBSで一度洗浄され、分離用ロート中に紡糸ナイロンファイバー（スクラブナイロンファイバーフェンウォールラバトリリー U.S.A.、イリノイ州、ディアフィールド） 1g を含有するカラムを通過せられた。メロゾイトは前述のように、遠心分離で回収され、RNA単離のためにドライアイス上で凍結されるか、または更にジエチルアミノエチルセルロース（DEAE, ワットマンDE52, ワットマン, U.S.A.、ニュージャージー州、クリフトン）中で

水相は、プロテインナーゼX $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ で37℃30分間消化（分解）され、同量のフェノール：クロロホルム（1：1）で再抽出され、核酸は2倍容量のエタノールでドライアイス上で1時間、又は-20℃で一晩で沈澱された。ペレット（沈澱）は、 $10,000 \times g$ 1時間の遠心分離後、TE（ 10mM Tris, $\text{pH}7.5$, 2mM EDTA）中に再懸濁され、20時間15℃で $150,000 \times g$ で4mlのCsClクッション（ 5.7M CsCl, 0.1M EDTA）を通し回転された。

RNAの沈澱は 0.2M 酢酸カリウム溶液から2.5倍容量のエタノールで再沈澱された。この全RNAはアニアティス前述文献p197に記載されたようにポリ(A)⁺ RNAを濃縮するためにオリゴ-dTセルロース上を一度通過させられた。典型的には、 5×10^8 のメロゾイトからの全RNA 1.9mg の産量には、約 $20\mu\text{g}$ のポリ(A)⁺ RNAを含有している。

2.5 接合子蠶及びメロゾイトのcDNAの合成及びフェージベクターへの挿入

2本鎖cDNAは、胞子形成している接合子蠶ポリ(A)⁺ $6\mu\text{g}$ から、グブラー (Gubler) らにより

Gene 25:263(1983)に記載された方法で、オリゴ(dT) プライマーから伸長させるための逆転写酵素(BRL)及び相補鎖を合成するためのE.Coli DNAポリメラーゼI(ニューイングランド バイオラブズ)を用いて、合成された。2本鎖cDNAはT4 DNAポリメラーゼ(BRL)で非付着性プラント末端化され、そしてEcoRIメチラーゼ(ニューイングランド バイオラブズ)で処理後EcoRIリンカー(GGAATTC, コラボレーティブリサーチ)が、製造元のプロトコールにしたがって、付加された。

このようにして調製されたcDNAをEcoRIで(切断)消化した後、ヒュン(Huynh)らによりディー・グローバー(D.Glover)編 DNAクローニング巻1、実際のアプローチ、1985、IRL プレス、ワシントン、D.C.p49-78に記載されたように、 λ gt11(ストラジーンクローニングシステムズ、サンジェゴ、カリフォルニア、U.S.A.)中にライブラリーが調製された。EcoRI cDNA断片は、EcoRIで分解(切断)し、脱リン酸化した λ gt11の腕(ストラジーンクローニングシステムズ)へ結合(ライゲート)

結合された。EcoRIでの分解(切断)の後、cDNAはBioigel A-50M中で過剰のリンカー分子、及び約300b.pより小さいcDNAを除去するためにHuynhらの前述の文献に記載されたように、分画された。

cDNAは λ gt11の腕へ結合され、先述のように、上記DNAは、ファージへパッケージされた。得られたライブラリーは、約50,000のファージを含んでおり、Y1088宿主細胞上でプレーティングすることにより増幅させられた。IPTG存在下でのX-galプレート上でのブラック分析により約90%の組換えが示された。

3. cDNAライブラリーの免疫学的スクリーニング

λ gt11メロゾイドcDNA発現ライブラリーは、150mmプレートあたり10,000ブラックの濃度でY1090細胞(ATCC No37197)上へプレートされた。6枚の上記プレートは、42℃で3.5時間培養され、 β -ガラクトシダーゼ融合蛋白質の発現を誘導するために、あらかじめ10mM IPTGに浸たされたニトロセルロースフィルターで重層され、37℃で更に4~5時間から1晩培養された。フィルターは、

された。得られたDNAはGigapack®キット(ストラジーンクローニングシステム)で、製造元のプロトコールにしたがい、ファージ中へパッケージされた。

得られたライブラリーは、Y1088の宿主細胞(ATCC No37195)上でプレーティングすることにより増幅させられた。組換えの比率は、(マニアティス、前述文献、p24)イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG、シグマケミカル Co.)の存在下で、X-galプレート上で青と無色のブラックの比から約90%と見積られた。

メロゾイトポリ(A)+RNAの2本鎖cDNAのコピーは、実質的には、上述のように合成された。変性ゲルでの移動から判断して[ベイリー(Bailey)ら Anal. Biochem. 70:75(1976)]、ライブラリーの構築に用いられた2本鎖cDNAは約200~4,500塩基対を含む。

メロゾイトcDNAはメチル化されCCGAATTCGGリンカー(コラボレーティブリサーチ)が用いられた点を除いては、先述のように、EcoRIリンカーへ

プレートから取り除かれTBS(20mM Tris, pH8.0, 0.5M NaCl)で数回のパッチ式洗浄に付された。非特異的な蛋白質結合部位は、20%牛胎児血清含有TBSで4℃でロータリーシェーカー上で2~4時間培養することでブロックされた。

メロゾイト抗原と反応することが公知の9種のモノクローナル(7D4, 7D1, 20C6, 13A6, 20C1, 11B6, 3A5, 13A1及び15B2と命名)のための腹水がブールされ、最終容量100 μ l中に20% FCS、0.15M NaClとなるよう調整され、ペトリ皿あたり2フィルターの割合で、ペトリ皿中の各々のフィルターに注がれた。フィルターは、一次モノクローナル抗体ブールと4℃で一晩ロータリーシェーカー上で培養された。非結合抗体は、室温で、TBSでフィルターを5~6回洗浄することにより除去された。結合抗体は、ホークス(Hawkes)ら、Anal. Biochem. 119:142(1982)に記載されたように、フィルターをホースラディッシュペルオキシダーゼ(HPOD)結合(ペーリンガーマンハイム)抗マウスヤギ抗体とフィルターを培養し、次に3mg/ml

の4-クロロ-1-ナフトール (バイオラッド) 及び 0.018% H_2O_2 を用い発色させることにより検出された。

初期の高濃度スクリーニングで同定された陽性ブランクは、同じモノクローナル抗体プールを用いる2次スクリーニングでブランク精製された。各々の陽性のものは、陽性のものを多重グリッドアレイにプレートし、その各々がIPTGで誘導され、ニトロセルロースに移され、上記プールからのモノクローナル抗体の一つと培養された。 λ m2-4と命名された一つの陽性ファージは、上記プール中の8つの抗体の内3つの抗体、すなわち7D1抗体、7D4抗体及び20C6抗体により認識されると同定された。

最初のスクリーニングには、6A5、7B2、15A3、及び20C6抗体を含むモノクローナル抗体を用いられ、2次スクリーニングでは、7B2、15A3、20C6、及び8A2が用いられ、15A3、7B2及び20C6が3次スクリーニングでは用いられ、培養バッファーが更に0.05%のtween-20 (ポリオキシエチレン(20)

位に挿入された。これらのベクターはGene 38:31 (1985)にCrowl等によって述べられているようにして組み立てられた。両方の可能な方向づけでその入物を含むプラスミドが、Bernard等によって述べられている [Methods in Enzymology 58:482 (1979)] 適合するプラスミドpRK248cItsを保持する大腸菌株MC1061中に、Mandel等によって述べられている [J. Mol. Biol. 53:159 (1970)] ようにしてトランスフォームされた。菌株MC1061とプラスミドpRK248cItsはATCC (American Type Culture Collection) に寄託されておりそれぞれ受け入れ番号ATCC 33766及び53338が付与された。

細菌のトランスフォーマント (形質転換体) は0.5%のグルコースと0.5%のカザミノ酸を含有するM9増地 [Maniatis等、上記、68ページ] 中30℃で生育させられ、 λ P_Lプロモーターでの転写を誘発させるために、Crowl等、上記、によって述べられているように0.D.(550m μ)が0.5の時点で42℃に変えられる。2~3時間の培養 (incubation) の後、1mlの試料を取り、そして試料中

ソルビタンモノラウリル酸) を含有する点を除いて、胞子形成接合子cDNAライブラリーのスクリーニングにも同様な方法が用いられた。このようにして、 λ S1-3、 λ S1-4及び λ S1-7; λ S2-1、 λ S2-4及び λ S2-5; 並びに λ S3-1と命名された。それぞれモノクローナル抗体6A5、8A2及び7B2により認識されるブランクが接合子cDNAライブラリー中に同定された。6A5抗体と反応する蛋白質を産生するファージから作られたDNAがEcoRIによる消化 (切断) 及びアガロースゲル中での電気泳動 (マニアティス (Maniatis) ら、前述文献p150) により分析された。ほぼ1150、890及び615の塩基対のサイズを持つ3つの異なる挿入部がこのようにして発見された。

4. 大腸菌中でのアイメリア (BIMERIA) 遺伝子の発現

ファージ λ S1-7と λ S1-3からの1.1 kbと0.9 kb EcoRI DNA分子がそれぞれ分離され、そして3つの可変読み枠発現ベクター、すなわちpEV-vrf1、pEV-vrf2及びpEV-vrf3、のそれぞれのEcoRIの部

の細胞は遠心分離により集められた。細胞のペレットはCrowl等、上記、によって述べられているように取り扱われ、そのリゼートはLaemmli等、Nature 227:680 (1970)、によって述べられているようにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけられた。電気泳動に続いて、ゲル中の蛋白質はクマシー (Coomassie) ブリリアントブルーで着色されたか、又は6A5モノクローナル抗体及びヤギ抗マウスHPODコンジュゲート (Conjugate) を検出のために使用する、ウェスタン・ブロット分析 [Towbin等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350 (1979); Burnetti, Anal. Biochem. 112:195 (1981)] のためのニトロセルロース膜に移された。

この分析は、ベクターpEV-vrf1中の1方向での0.9 kb cDNA分子が6A5抗体と反応する20kdの蛋白質を生産するというを示していた。1.1 kb分子に関しては、それが多分5'側をコードしていない (5' non coding) 配列を含んでいるためであるが、発現は観察されなかった。この蛋白質の生

産を最も効果的にするために、種々の発現培地が試験された。より好適な培地はリットル(±10%) 当り KH_2PO_4 6.0 g, K_2HPO_4 4.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g, 酵母抽出物 21.0 g, バクトトリプトン(Bacto Tryptone) 3.5 g, LB625 アンチフォーム(Antifoam) 1.0 ml, グルコース 25 g, チアミン-HCl 70mg, ビタミン溶液(GIBCO MBM (100X) ビタミン溶液) 2.5 ml 及び微量元素 1.0 ml, を含有していることが明らかとなった。Union Carbide の製品であるLB625 アンチフォームは37.8℃で625 セイボルトユニバーサルセコンド(Saybolt Universal Seconds)の粘度を有するエチレンとポリプロピレンオキサイドの線状ポリマーである。

発酵ブロス1リットル当りのビタミンはD-Caパントテン酸塩、塩化コリン、葉酸、ニコチンアミド、ピリドキサル-HCl 及び付加的なチアミン-HCl のそれぞれ0.25mg; L-イノシトール0.50mg; 及びリボフラビン0.025mgを含有していた。ブロスリッター当りの微量元素は、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を2.7

mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ のそれぞれを0.8mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ のそれぞれを0.7mg; H_3BO_3 を0.2 mg; そして $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.5 mg含有していた。

ファージ λ 2-4によって発現された免疫反応性(immunoreactive)蛋白質の性質は、許容(30℃)及び非許容(42℃)温度での差別的な生育によって、Y1090細胞の感染から分離されたライソジェン(lysogen)中においてまず、研究された。このライソジェンによって合成された蛋白質のウェスタン・ブロット分析のために、50mlの培養物(culture)はLB培地[Maniatis等、上記、69ページ]中、30℃で0.0.(550mμ)が0.5になるまで生育させられ、ファージの複製を誘発するために42℃に変えられた。42℃で15分後、IPTGを10mMになるように加え、培養を37℃で30分間継続した。細胞は4℃で遠心分離によって集められ、そしてLaemmliの試料緩衝液(0.125Mトリス、pH6.8, 1%(w/v) SDS, 1.4M β-メルカプトエタノール、0.01%プロモフェノールブルー(W/V)、20%(v/v)

グリセロール)中、5分間煮沸することによって分離させられた。

培養物の1.0 mlの同等物が12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動法によって分析され、電気泳動的にニトロセルロース移行させられそして、 λ 2-4ファージを確認する3つのモノクローナル抗体(7D1, 7D4 及び20C6)のプールを上記したようにしてプローブ(probe)させた。ウェスタンブロットの発現は、誘導したライソジェン(第10図、パネルB、レーン2)中に存在する150 kdサイズよりも大きい融合蛋白質を明らかにした。β-ガラクトシダーゼに特異的な抗体もまたこの高分子量の蛋白質と反応し、そして約114kdの蛋白質;すなわち、β-ガラクトシダーゼのみの期待されるサイズ(第10図、パネルA、レーン2)である、に反応を示した。

ファージ λ 2-4 DNAはEcoRIで消化され、1.7 kb DNA分子が生成した。この分子は、プラスミドpEV-VRF1、2及び3[Crowl等、上記]を含有するEcoRI-線状化プラスミドプール中にサブクロ-

ン化され、そして、上記したようにして、プラスミドPRK248cItsを含む大腸菌菌株MC1061中に形質転換させられた。形質転換体は、 λ 2-4ライソジェン中、融合蛋白と反応することが示された3つのモノクローナル抗体のプールを使用して、温度誘発での免疫反応性の蛋白質の発現に対して、選抜させられた。免疫反応性の組換え蛋白質は更に、大腸菌溶解物(lysates)のウェスタンブロット分析により、3つのモノクローナル抗体の1つ、すなわち7D4をそのプールから用いて特徴づけられた。陽性のコロニーのそれぞれがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析によって決定されるように、望みの1.7 kb挿入物を有すプラスミドDNAを含有していること、及び誘発に基づく約65kdの蛋白質の合成を命令していることがわかった。

この65kd蛋白質の発現は生育培地及び誘発のためのプロトコール中、変化に対して比較的非感受性であることがわかった。この蛋白質は、細胞ペレットの音波粉碎のあとで表面部(supernatant)中で定量的に回収された。

1.7 kbの挿入物を含む発現プラスミドは、組換え蛋白質 (recombinant protein)の後の生産に使用された。そして、第11図に図式的に示されている。このプラスミドは、 λ cl857 (Arber等、in Cold Spring Harbor Monograph, Lambda II, 1983、Hendrix 等, Eds., Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, p450、によって示されているように λ ファージライソジェンの発生に対する標準方法を用いることによって調製される) に対し溶原性 (lysogenic)であるMC1061宿主細胞中で、30℃でプラスミド中の P_L プロモーターの抑制状態を維持するために増殖させられた。

同様な方法を用いて、約1.1 kbを有する胞子分裂する (sporulate) 接合子嚢 (oocyst) のcDNAの断片によって、コードされた28kd蛋白質の発現が行なわれた。この蛋白質はモノクローナル抗体 8A2に特異的に接合する。約1.2 kbの胞子分裂する接合子嚢のcDNAによってコードされた45kd蛋白質の発現も又実施された。この蛋白質はモノクローナル抗体7B2に特異的に結合する。

工物 (compression artifacts)を除去するために、dGTPで置換させられた。

配列分析を容易にするため、 λ SI-7からの1.1 kb EcoRIはプラスミドpEV3-SBQ (第12図)に移された。このプラスミドはpEV-rvf3のEcoRI 部位に隣接するポリリンカーを有している。このポリリンカーは、エキソヌクレアーゼIIIで一方の削除を生じさせるためにBamHI と Kpn I 部位でプラスミドを線状化するために使われた [Henikoff、Gene 28:351(1984)]。ポリリンカー中のXbaI部位は、Maxam-Gilbert の削除の配列化に適する3'-末端のラベル化のために使用される。そして、プライマーCGGTGCGACTCGAGCCAはサンガーの配列化のために用いられた。このプライマーは、Maniatis等、上記、122ページ、によって述べられているように、 $[\gamma^{32}P]$ ATP(ICN)とポリヌクレオチドキナーゼを用いてその5'末端を ^{32}P でラベルされた。

第13図は、Maxam-Gilbert 配列化のために使用する、1.1 kb EcoRI分子中の制限部位を示してい

5. DNA 配列分析

一般的に、標準の一晚の培養物の1 mlからのプラスミドDNAの小規模の分離はBirnbolm等 (Nucleic Acids Research 7:1513(1979))の操作を用いて行なわれた。この操作は分析目的のために細菌のコロニーからの少量のDNAの分離を考慮に入れている。プラスミドDNAのより多量の場合は、塩化セシウム遠心分離によって、標準プロトコルの後に1.2培養物を用いて調製される。(Maniatis等、上記、93ページ)。

胞子分裂する接合子嚢ライブラリーからのcDNAsのDNA配列は、スミス等、Cell 16:753(1979)及びWallace等、Gene 16:21(1981)によって、2重らせんプラスミドDNAが修正されたとおりに、Maxam 等、Methods in Enzymology 65:499(1980)、の化学的開裂法によって、またSanger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463(1977)、の鎖終結方法によって決定された。鎖終結のためのプロトコルにおいて、7-デアザ-dGTP (Barr等、BioTechniques 4:428(1986))は、G-Cの圧縮加

る。0.9 kb分子中のEcoRI 部位の位置もまた示されている。それは、これらもまた使われるからである。エキソヌクレアーゼIIIで作られた削除の末端の点もまた示されている。これらは、Maxam-Gilbert 法によるpEV3-SBQポリリンカー中のXbaI部位からのか、又はSanger法による、プライマーの伸長 (第12図)を用いて、配列化された。完全なcDNAの両方のスタンド (stands) は、これらの方法の1又は両方によって、配列化された。DNA中の高いG-C含有量のために、Maxam-Gilbert 反応は通常、8%と15%のポリアクリルアミド-尿素ゲルで分画させられた。

プライマーの伸長は、ポリ(A) \cdot RNAの1.5 μ gを、5'-末端をラベルした合成オリゴヌクレオチドプライマー、GAGGCTGCCATTTTGC、の2 pmolesとともに、42℃で60分間、Tris-HCl 50mM, pH8.0, MgSO₄ 8mM, NaCl 0.1M, ジチオトレイトール 2 mM, それぞれのデオキシヌクレオチドトリリン酸 (dNTP、Pharmacia Fine Chemicals) の2 mM、RNasin (Promega Biotec, Madison, WI) 20単位及び

AMV 逆転酵素 (Pharmacia, Piscataway, NJ, FPL Cpure) 20単位、中でインキュベートすることによって行なわれた。生産物は、配列分析のために用いられる8%アクリルアミド-尿素ゲル中で、分子サイズマーカーとして³²P-ラベル化のHpaII消化PBR322 DNAを用いて、分析された。

配列分析のために、最初の生産物はゲルから溶出させ、Maxam 等、上記、の化学的開裂法によって分析された。または、ddNTPsが伸長反応において、使用された。〔Tolan 等、J. Biol. Chem., **259**:1127 (1984), Graves等、J. Biol. Chem., **261**:11409 (1986)〕。反応は8%ポリアクリルアミド-尿素ゲル中で分析された。

1.1 kb cDNA 分子のヌクレオチド配列は第14図に示されている。0.9 kb分子の配列は、塩基188から塩基1082まで、この、より大きい分子内で伸長する。このヌクレオチド配列の開放読み枠 (openreading frame) 分析から予測されるアミノ酸配列は、第15図に示される。第15図に示される予測されるアミノ酸配列の正確さは、次のように

図でアンダーラインされている。

奇妙ながら、1.7 kb分子に対する、DNA 配列開放読み枠は、約33,349ダルトンの蛋白質をコードしていることが期待されそうである。然し、このDNA 断片からの発現生産物は、約65kdの明らかな分子量によってSDS ゲル中を移動する。予測されたものを観察された蛋白質サイズの間の、この相違の理由はわかっていない。この蛋白質は、ここでは「65kd」蛋白質と呼ぶ。

同じような態様で、モノクローナル抗体8A2 によって認識された28kd蛋白質をコードするcDNA分子のヌクレオチドと予測されたアミノ酸の配列が、第18及び19図において、それぞれ示される結果によって決定された。

同じように、1.2 kb 7B2 cDNA のヌクレオチドと予測されたアミノ酸の配列が決定された。連続する開放読み枠が見つかり、スピロゾイトから免疫沈降によって分離された蛋白質が200kd よりも大きかったことから、プローブとして、1.2 kb cDNA を用い、そのライブラリーは、より大きい

して確認された。

第15図の残基41-54 と145-164 に対応するアミノ酸配列を有する、合成ポリペプチドが調製された。これらのポリペプチドの両方に対して集められた (raised) ウサギ抗血清が、全スピロゾイト蛋白質と0.9 kb cDNA を発現する大腸菌のリゼートの両方のウェスタンブロット分析において使用された。そのポリペプチドの両方に対する抗体が、ウェスタンブロットの両者において蛋白質に結合した。

同様な方法を用いて、ファージ λ m2-4中に65kdの蛋白質をコードする1.7 kb挿入物のヌクレオチド配列が、第16図に示される結果を用いて決定された。このDNA 配列によってコードされた蛋白質の予測されたアミノ酸配列が第17図に示されている。この配列は、下記のようにして、発現された65kd蛋白質のトリプシン消化によって製造されたポリペプチドに対して行なわれたアミノ酸配列分析によって確認された。これらのペプチドの幾つかに対応する全部のアミノ酸配列中の領域が第17

cDNAs に対してふり分けられた。

このようにして第20図及び21図にそれぞれ示されるヌクレオチドと予測されるアミノ酸の配列とを有している、3.2 kb cDNA が得られた。

6. 65kd蛋白質の精製と特性記述

6.1 蛋白質の精製

pEV/2-4 発現プラスミドを有する大腸菌HC1061 (pRK248clts)の高細胞濃度発酵が、10 L発酵槽で、1.5×M-9 培地中において、許容される温度で約4時間の生育の後、上記したようにして、温度誘発の標準プロトコルを用いて、行なわれた。細胞塊は誘発の後5時間収穫され、細胞ペースト500 gをもたらしした。

大腸菌細胞ペースト50g がTris-HCl 10mM, EDTA 5 mM, pH 8.0 の500ml中に均一に懸濁させられ2時間2-8℃で攪拌させられた。

懸濁液は、ガウリン (Gaulin) ホモゲナイザー (APV Gaulin, Everett, Massachusetts, U.S.A) を7,000 psi で2-3回通過させた。細胞リゼートは、ソルバル (Sorvall) RC-5遠心分離機で1時間

24,000×g で遠心分離した。そして、そのペレットは捨てた。固形の硫酸が上清液（最終濃度80%）になるよう加えられた。これは、4℃に2時間保たれ、24,000×g で1時間遠心分離させられた。そのペレットは20mMリン酸カリウム、pH 6.8、中に溶解させられた。遠心分離後、上清液は20mMリン酸カリウム、pH 6.8、に対して透析させられた。

ファーマシアグラスカラム（5cm直径×10cm長さ）は、P-DE200®（200オングストローム、40-60μm、弱アニオン交換、Separation Industries, Metuchen, NJ）シリカ支持体で詰められた。ゲルは20mMリン酸カリ、pH 6.8、で平衡にさせられた。試料が加えられ（10ml/min）、平衡緩衝液で洗浄させられ、0.4M NaCl、pH 6.8、を含有する20mMリン酸カリで溶出させられた。カラム分画は、65kd蛋白質を検出するために抗体7D4を用いてウェスタンブロットによって分析された。

免疫アフィニティカラムが、65kd蛋白質を更に精製するために使用された。このカラムのための吸収剤は、モノクローナル抗体7D4をNuGel P-ボ

リアルデヒド®（500オングストローム、40-60μm、Separation Industries, Metuchen, New Jersey, U.S.A.）シリカ支持体上に固定化することによって調製された。固定化の操作は次の工程を含む：ポリアルデヒド支持体 10gが懸濁化され、0.1Mリン酸カリ、0.1M NaCl、pH 6.8で洗浄され、8mg/mlの蛋白質濃度に対してモノクローナル抗体20mlを含むエレンマイヤーフラスコに定量的に移した。ソディウムシアノボロハイドライド（Sodium cyanoborohydride）（4mg）がその後懸濁液に添加された。混合液は4℃で、16時間ゆっくり振られた。ゲルは濾過され0.1Mリン酸カリウム、0.1M NaCl、pH 6.8、で洗浄された。プールされた濾過物は、結合していない抗体が調査された。結合密度（Binding density）は支持体の8mg/gであった。結合していない活性化部位は、そのゲルを1M エタノールアミン、pH 7.5の20ml中に懸濁させることによって封鎖された。ソディウムシアノボロハイドライド（Sodium cyanoborohydride）（4mg）が懸濁液に加えられ、それは4℃で16時

間攪拌された。ゲルは集められ、冷却カップリング緩衝液で徹底的に洗浄された。

免疫アフィニティクロマトグラフを行なうために、カラム（1cm×10cm）は固定化した7D4抗体で詰められ、0.1%トライトン（Triton）X-100を含有する冷却リン酸緩衝化含塩物（buffered saline）（PBS）で平衡化された。65kd蛋白質を含有するNuGel P-DE 200®カラムからの分画物のプールは、0.1%トライトン（Triton）X-100を含有するPBSで2倍（2×）に希釈され、10ml/minの流速でカラムに加えられた。加えた後、ゲルは結合していない物質を除くためにPBSで洗浄された。吸着した免疫反応性（immunoreactive）物質は、0.3M 酢酸、0.1M NaCl、pH 2.7、の緩衝液で溶出させられた。蛋白質はその後YM10膜（Amicon, Div. W.R. Grace & Co. Danvers, Massachusetts, U.S.A.）を使用するアミコンスチルセル®（Amicon Stircell）装置で濃縮された。

蛋白質の純度は、Laemmliによって述べられている（Nature 227:680（1970））ように、SDS ポリ

アクリルアミドゲル電気泳動法によって決定された。ゲルはクマシー（Coomassie）ブルーで着色させられた。又、ウェスタンブロット分析は、7D4モノクローナル抗体をヤギ抗マウス西洋ワサビパーオキシダーゼコンジュゲート（Conjugate）とともに用い、実施された。結果は第22図に示されている。レーン2、3、4及び5は2つの調製物からの精製蛋白質を含有している。レーン1及び6はその図面の左及び右に示された分子量を有する分子量マーカー蛋白質の混合物を含んでいる。蛋白質の10マイクログラムがそれぞれのレーンに流された。

第22図において、精製された蛋白質が、SDS ゲル中を約65kdの明らかな分子量を有する主要なバンドとして、より高いまたより低い移動度を有する小さいバンドと共に移動していくということがわかる。

6.2 等電点の決定

精製した65kd蛋白質の10マイクログラムは、LKB Instruments, Galthersburg, Maryland, U.S.A. か

ら得られる予め形成された等電的集中化(isoelectric focusing)ゲル中で等電集中化(focusing)を受けた。既知の等電点を有する標準蛋白質の混合物が同時に通過させられた。ゲルは、3.5-9.5のpH勾配で製品説明に従って50mA, 1,500Vで約2時間の間通過させられた。

電気的集中化(electrofocusing)の完了の後、そのゲルは蛋白質のバンドの検出のためクマシー(Coomassie)ブルー染色液で着色された。精製された蛋白質の等電点は、標準蛋白質の位置との関係でpH勾配内でのバンドの位置を測定することによって決定される。このようにして決定されたその蛋白質の等電点は4.6であった。

6.3 アミノ酸組成分析

アミノ酸組成分析は、Pan 等、蛋白質微小特定記述の方法において (in Methods of Protein Microcharacterization) 1986, Shively, ed., The Humana Press, pp.105-119. によって記述されているように、フルオレスアミン(fluorescamine)との次のカラム反応を用いて行なわれた。65kd蛋

白質の3 μ g を含む試料は、4%チオグリコール酸を含む、6N HCl 中で、20~24時間、真空中で加水分解させられた、そして加水分解物の10%が分析のために使用された。システイン値は過錳酸(performic acid)酸化の後で決定された。結果は第3表に示されている。

(本頁以下余白)

第3表
65KD蛋白質のアミノ酸組成分析

アミノ酸	モルパーセント
Asp	6.06
Thr	6.07
Ser	7.27
Glu	18.24
Pro	5.35
Gly	16.76
Ala	11.71
Cys	4.45
Val	4.88
Met	2.08
Ile	2.17
Leu	3.22
Tyr	2.20
Phe	2.13
His	1.07
Lys	2.72
Arg	3.61
Trp	ND

ND = 未決定

6.4 N-及びC-末端配列分析

蛋白質の200ピコモル(アミノ酸組成分析によって決定されたとおり)は、Hewick等、J. Biol. Chem. 256:7990(1981), の方法と、応用バイオシステムモデル 470A シークエンサー(Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, U.S.A.)を用いてN-末端分析を受けた。このようにして決定されたN-末端配列はM-N-K-N-S-?-L-G-G-P-?-S-M-Q-E-S-P-P-P-であった。疑問符によって指示された位置でのアミノ酸残基の正体は、PTH-Cysの収量が少なかったため不確実である。そして、システイン残基はジスルフィド結合に含まれる(Hewick等、J. Biol. Chem. 256:7990(1981))。

C末端分析は、Hayashi, Methods in Enzymology 47:84(1977), によって述べられているように、時間コース(time course)カルボキシペプチダーゼY消化によって、65kd蛋白質の1200ピコモルに対して行なわれた。カルボキシペプチダーゼY(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)は、0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.9中0.8 μ g

／350 μ l の濃度で使用された。そして、試料分画 (alliquots) が分析のため、0.2, 5, 10, 20 及び 30 分後に採取された。試料分画 (alliquots) は一層進む反応を停止させるため HCl で酸性化され、その後前記のようにしてアミノ酸分析を受ける。この分析は、C-末端でのアミノ酸配列は多分 (Met, Trp)-Ala-Serであることを示していた。トリプトファンはメチオニンと共に、同時に増加することが観察された。しかし、Trp は、それがフルオレスアミンと低い反応性を有するので、フルオレスアミン (fluorescamine) 分析器で定量することは困難である。それ故、Trp と Met の相対位置はこの分析による確実性によって決定はできない。

6.5 トリプシンペプチド分析

65kd 蛋白質をコードする cDNA のヌクレオチド配列から予測されるアミノ酸配列を一部分確認するため、幾らかの蛋白質がトリプシン (Cooper Bio-medical, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.) で消化された。そして、生成したペプチドは下記のようにして配列が決められた。

析によってまず第 1 に分析された。その後、HPLC カラムからのペプチドのピークの殆んどは、応用バイオシステムモデル 470A ガス相シーケンサー (Applied Biosystems Model 470A gas phase sequencer) を使用し、自動化エドマン分解によって配列が決められた。フェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸誘導体は、Hawke 等、[Anal. Biochem. 120: 302 (1982)]、によって述べられている Altex ultrasphere C-18 カラムを使用する、水 HPLC システム (a Waters HPLC system) で、または、応用バイオシステムモデル (Applied Biosystems Model) 120A、オンライン PTH アミノ酸分析機において、確認された。

これらのペプチドの幾つかのアミノ酸配列は、第 17 図の下線を入れた領域に示されている。これらのペプチドのそれぞれの数 (HPLC ピーク数に対応する) は、対応する配列のそばに丸で囲んで示してある。ペプチド配列中の残基の幾つかの正体 (identity) の不確実さは、ペプチドのアミノ酸組成分析が予想配列の対応位置に表示されたアミノ

トリプシン消化物は、0.2M 重炭酸アンモニウム (ammonium bicarbonate), pH 8、中の蛋白質 148 μ g に対して、1:30 (重量又はモルベース) の酵素対基質比を用いて、37°C で一夜行なった。このようにして生成したペプチドは、0.1% (基準) トリフルオロ酢酸中増加するアセトニトリルの 0 から 55% の勾配によって、Altex ultrasphere 250 \times 4.6mm C-18 カラム (Beckman Instruments, Fullerton, CA) を使用する、水 HPLC システム (a Waters HPLC system) において分離させられた。HPLC 分離の前に、消化物はペプチド中のジスルフィド結合をいずれも破壊するために、37°C で 30 分、 β -メルカプトエタノールで還元させられた。カラム流出液は実験室データ制御検出器 (Laboratory Data Control, Rivera Beach, Florida, U.S.A.) を使用し 215nm で監視された。HPLC カラムは、第 23A 図に示されるように、8 つの主要ピークに分解した。

それぞれのピークは、ペプチドの量と組成の両方を決定するために、上記したようにアミノ酸分

析がペプチド中に存在するということを示しているけれども、それらの位置に疑問符によって表示されている。ペプチド残基の幾つかの正体 (identity) の不確実さは、フルオレスアミン (fluorescamine) とのトリプトファンの低反応性のためであった。

完全な 65kd 蛋白質の N-末端に対応している、ペプチド 6 は、発現プラスミド中にヌクレオチドによってコードされている N-末端に 4 残基を含有している。ペプチド 8 の分析は、ペプチド 3 のアミノ酸配列に類似しているが、しかし 4C-末端残基を欠いているアミノ酸配列を明示しており、それは多分不完全なトリプシン消化の結果であるということを示唆している。ペプチド 5 は、このペプチドのアミノ酸組成分析がペプチド 6 と同様であるが、N-末端の最初の 3 アミノ酸が足りないということを、それが示しているために、配列が決められていない。

前記したように、しかし前のメルカプトエタノール還元は行なわないで実施されたトリプシン消

化物のHPLC分析は、ピーク4、7及び8が存在しない(第23B図)溶出のプロフィール(輪郭)を明示した。この観察は、シスチン含有ペプチドが還元されていない蛋白質において多分ジスルフィド結合形成に巻き込まれ(involve)しているということを示唆している。

7. 家禽の免疫化(Poultry immunization)

7.1 65kd抗原の使用

精製した組み換え(recombinant) 65kd蛋白質の投与がアイメリアテネラ(*Eimeria tenella*)胞子分裂する接合子嚢(sporulated oocysts)によるチャレンジに対して鶏(chickens)を保護できるかどうかを決定するために、一連の免疫にする実験が行なわれた。これらの実験において、1日~3週の年令のレグホン鶏(Leghorn chickens)(Avian Services, Frenchtown, New Jersey, U.S.A.)が清潔な室に置かれ、そして、チャレンジの時期まで他の鳥類と接触していない看護人(attendants)によって世話をされた。鳥類は、それらが3又は4週の年令になるまで電氣的に加熱された、ひな

保育箱(brooder)のかご中に置かれた。その後、成長させる鳥かご(grow-out cages)に移された。薬を混入されていないブロイラーのスターター飼料及び水が実験全体にわたって随意に供給された。接合子嚢(oocysts)のチャレンジの時点で、鳥は実験の終りまで置かれる他の建物に移された。動物の治療状況は、免疫にする前は一週間に少なくとも3回、そして免疫の後は毎日を標準として検査される。鳥は、色々な試験グループに任意に割り当てる前に、3~4週の年令で翼のバンドによって個々のものが確認された。

前記したように、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって精製された65kd蛋白質の色々なロットが免疫原として使用された。免疫原のこれらのロットは、United States Pharmacopeia, 21st Revision, 1985, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md., pp.1165-1167; において述べられているようにして決定され定義された活性については、蛋白質の μg 当り約0.3から約50エンドトキシン単位の範囲にある細菌の

エンドトキシン活性を含有していた。その蛋白質は使用前に0.02M K_2HPO_4 緩衝液、pH6.8に溶解させられ、そして必要とするときに同じ緩衝液で希釈させられた。

ウシ血清アルブミン(BSA, Pentex)が対照として使用された。使用された免疫原にビロゲン活性が存在していたために、このような活性の凡そ等量が、この活性のためかもしれないどんな非特異的な影響も明らかにする(account for)ために、全てのBSAコントロールに対して加えられた。このビロゲン活性は、大腸菌を高周波音分解により崩壊することにより、そしてその後0.45 μ ミリ細孔(Millipore)フィルターを通して、その物質を濾過することにより調製された非形質転換大腸菌リゼートの形態でBSAに添加された。

コントロールBSAの希釈試料又はアイメリア(*Eimeria*)抗原はアジュバントの等量と合せられ投与の前に18ゲージ針を備え付けた、ガラスシリンジで完全に混合された。Freundの完全なアジュバントと不完全なアジュバントとは、それぞれ最

初でかつ補助注射(booster)の免疫化に使用された。両方のアジュバントは、GIBCO, Grand Island, New York, U.S.A., から入手された。

最初の免疫は、鳥が4週年令のとき、首の基部で体の背部に皮下で行なわれた。幾らかの鳥は6週の年令で、補助注射(booster)の免疫も受けた。注射された物質の量は約0.4~2.4 mlの範囲であった。より多い量では、投薬量(dose)は2回の注射に分割された。最後のワクチン注射の後2~3週間、鳥は経口的に与えられた、*E. tenella*の25,000又は50,000の胞子分裂した接合子嚢(sporulated oocyst)でチャレンジされた。感染の後の7日で、生き残った鳥は犠牲にされ、死体解剖され、そして全部の病変に対して採点された。実験中に死んだ全ての鳥もまた死体解剖された。診断がなされ、腸の病変は0=正常、1=わずかな病変(Infestation)、2=適度の病変(Infestation)、3=猛烈な病変及び4=死、のように採点された。得られた表示は、鳥のグループごとに対し感染の平均程度としてまとめられた。鳥は又感染の時点

と感染後7日目に重量が測られた。幾つかの鳥はBSA又はコシジアル(coccidial)抗原でワクチン注射されていないが、感染又は非感染のワクチン注射されていないコントロールとして取り扱われた。

2つの実験の結果を第4表に示す。

(本頁以下余白)

第 4 表
遺伝子組み換えによる65キログルトンの精製抗原で1回
もしくは2回皮下にワクチンを接種されたヒナドリの免疫の効果

鳥 (No)	処 理*	各週令における接種		発病度の スコア ^b	体 重 増/減 (g)
		4週令	6週令		
		実 験 1			
10	IUC	-	-	2.8	-25
8	Antigen	3.15	-	2.4	-44
10	Antigen	12.25	-	2.5	-10
6	BSA	17.5	-	3.0	+40
10	UUC	-	-	0	+107
10	IUC	-	-	2.9	-40
8	Antigen	3.15	1.6	2.0 ^a	-15
10	Antigen	17.5	13.2	1.8 ^a	+5
8	BSA	12.25	13.2	2.5	-13
10	UUC	-	-	0	+87
実 験 2					
8 ^d	IUC	-	-	2.6	-11
10	Antigen	4	-	2.2	+65
10	Antigen	20	-	2.0	+19
9	Antigen	100	-	2.9	+14
10	BSA	100	-	2.4	-7
10	IUC	-	-	2.5	+15
10	Antigen	4	4	2.1	+35
10	Antigen	20	20	2.0	+74
8	Antigen	100	100	2.1	+81
10	BSA	100	100	2.4	+69
4	UUC	-	-	0	-3

a. IUC, Antigen, BSA, UUCは、各々、(のう胞体)感染させた免疫していない対照区、精製された分子量65キログルトンのタンパク、ウシ血清アルブミン、感染させておらず免疫していない対照区、を示す。

b. 実験1においては、最初のワクチン接種をしてから3週間後のヒナドリに胞子形成されたE. tenella ののう胞体50,000個を投与した。また、追加のワクチン接種を行ったヒナドリについては、該(2回目の)接種を行ってから2週間後に25,000個ののう胞体を投与した。実験2では、のう胞体投与の時期は実験1と同様であるが、一次接種したヒナドリ、追加接種をも行ったヒナドリともに25,000個ののう胞体を投与した。各実験において感染させた非免疫対照区を設け、同じ生育段階において、即ち屠殺の7日前に、胞子形成されたのう胞体を各々一定数ずつ投与した。結果は、text記載のように、0-4の得点に基づいている。

c. 数値は、ヒナドリの球虫(のう胞体)感染時

の体重と、感染時より7日後の体重の差を示す。

d. この区では当初、ヒナドリを9個体用いたが、1週間後2個体が死亡した。

e. IUCと比較して $P \leq 0.05$

第4表のデータは、分子量65,000のタンパクで免疫しておく、IUC区と比較して一般に病変の度合いが減少したことを示している。実験1においては、追加のワクチン接種がなされた2つの処理区(表中のe)のヒナドリには、統計上有意な発病度の減少がみられた。他の区では、これほど大きな発病度の減少はなかったが、それにもかかわらず、ワクチン接種されたヒナドリにおいては、概して体重は増加した。

三度目のワクチン接種が、抵抗力をさらに高めるのか否か明らかにするため、実験が行われた。

(即ち、)ヒナドリ8個体からなる各(処理)区について、ワクチン接種なしで感染させた、または感染させない対照区を設けたり、もしくはBSAやメロゾイト(分裂小体)のタンパクを、3週令及び5週令、または3, 5, 7週の各段階におい

て接種したりした。最初の2回のワクチン注射にはフロイントの完全アジュバントを用いて行った。3回目を行うときは、フロイントの不完全アジュバントを用いた。接種は前記したように皮下（注射）で行われた。

最終接種から2週間後、ヒナドリ各々に *E. tenella* の孢子形成されたのう胞体25,000が投与された。各ヒナドリの体重を、のう胞体投与時とその1週間後、即ち屠殺して病変度スコアをはかる時点で測定した。結果を第5表に示す。

(本頁以下余白)

第5表
遺伝子組換えによる65キログルトンの精製抗原で2回
もしくは3回皮下にワクチン接種されたヒナドリの免疫の効果

処 理	3週令	各週令に投与される接種量	7週令	免疫度のスコア	体重(g)
IUC	-	-	-	2.13	+59
Antigen	4	4	-	1.75	+122
Antigen	4	4	-	2.88	+128
Antigen	20	20	-	1.88	+87
Antigen	20	20	-	1.88	+69
BSA	20	20	-	3.13	+106
BSA	20	20	-	2.38	+131
UUC	-	-	-	0	+131
IUC	-	-	-	2.25	+23
Antigen	4	4	4	2.25	+91
Antigen	20	20	20	2.25	+86
BSA	20	20	20	1.75	+78

- a. IUC, Antigen, BSA, UUCは、各々、(のう胞体)を感染させた免疫していない対照区、精製された65キログルトンのタンパク、ウシ血清アルブミン、感染させておらず免疫もしない対照区、を示す。
- b. 最後のワクチン接種から2週間後、*E. tenella* の孢子形成されたのう胞体25,000をヒナドリに投与した。対照区のヒナドリは2回免疫用、3回免疫用のものは感染させた時点でそれぞれ7週令、9週令であった。結果は、テキスト記載のように、0-4までのスコアに基づいている。
- c. 数値は、ヒナドリの感染時の体重と、感染時より7日後の体重の差を示す。

第5表のデータは、3回のワクチン接種により、抵抗力は増強されなかったことを示す。cecal 病変度の減少によって示されるように、IUC 区もしくはBSA 接種区と比較して、抗原投与区のヒナドリにはより強い抵抗力が与えられた。

皮下注射以外の投与経路を採用することで、さらにより結果が得られるものか否か明らかにする

ため、分子量65キログルトンのタンパク注射の2回分の量を2週間間隔で、3週令のレグホン種ヒナドリ8個体ずつに対し、皮内、皮下、筋肉内、経口、肛門という各々の経路で3回投与した。最終抗原投与から2週間後、*E. tenella* の孢子形成されたのう胞体25,000を各区のヒナドリに経口で投与した。さらに1週間の後、各ヒナドリを屠殺し、病変度のスコアを測定した。

皮下注射は前述と同様に行った。筋肉内注射は左腿部外側の深部に行った。皮下注射は右翼前方形に行われた。経口投与は長さ5 cm、18ゲージのボールチップ型の針を用いて行い、注射物を喉のう部に蓄積させた。肛門部からの投与には5 cm、18ゲージのオリブチップ型の針を用いて、排出腔を開いた状態で針を最大限に挿入して行った。経口投与、もしくは肛門投与後は、各々ヒナドリを数分間、立たせておくか逆さにしておくかした。これは、接種物が体外に放出されてしまうのを防ぐためであった。

皮下注射に際しては、投与物の形態は上述と同

模、(即ち、) 1次注射にはフロイントの完全アジュバントを、追加注射にはフロイントの不完全アジュバントを用いた。他の投与経路の場合の投与形態は、規定量のタンパクを含む0.02M pH6.8のリン酸水素ナトリウム緩衝溶液とした。結果を第6表に示す。

(本頁以下余白)

表 6
65KD抗原による腸のワクチン注射の種々投与経路の効能

Treatment/ Route ^a	各週齢における接種量			免疫度の スコア ^b	腸/鼠 (g)
	3週令	5週令	7週令		
IUC	-	-	-	2.9	+58
Antigen/SC	5	5	5	2.3	+66
Antigen/SC	25	25	25	2.8	+68
BSA/SC	25	25	25	2.8	+47
Antigen/IM	5	5	5	2.3	+33
Antigen/IM	25	25	25	2.3	+72
Antigen/A	5	5	5	2.5	+53
Antigen/A	25	25	25	2.6	+50
Antigen/O	5	5	5	1.8 ^c	+67
Antigen/O	25	25	25	2.5	+87
Antigen/ID	5	5	5	2.1	+26
Antigen/ID	25	25	25	1.9 ^c	+114
UUC	-	-	-	0	+114

a. IUC, Antigen, BSA, UUCは、各々、(のう胞体を)感染させた免疫していない対照区、精製された分子量65キロダルトンのタンパク、ウシ血清アルブミン、感染させておらず免疫もしていない対照区、を示す。SC, IM, A, O, IDは、各々、投与経路として皮下、筋肉内、肛門、経口、皮膚内を示す。

b. ワクチン接種区のヒナドリについては、最終接種から2週間後、IUC については、屠殺の7日前に各々25,000の*E. tenella*の孢子形成されたのう胞体を投与した。これらIUC 対照区のヒナドリは、感染時(のう胞体投与時)9週令であった。結果は、テキスト記載のように、0-4の得点に基づくものである。

c. 数値は、ヒナドリの球虫感染時の体重と、感染時から7日後の体重の差を示す。

d. IUC と比較して $P < 0.05$

第6表の結果は、抗原5 μ g を経口投与したヒナドリ及び同25 μ g を皮下投与したヒナドリの病変度のスコアが最も少ないことを示している。こ

れらの結果は統計上有意であった。その他の投与経路をとった場合でも、また、上記と異なる投与量でも、cecal 病変度の減少が見られ、抵抗力が生じる傾向にあることが示唆された。しかし、これら(試験区の)値とIUC 区の値との間には、有意な差はみられなかった。

上述の実験において、抗原(ワクチン)投与量と、それに対する反応に一次的な相関関係がみられなかったが、これは、65キロダルトンの抗原中の微量の夾雑物質及び/または発熱物質含有量の差違に起因するものであるか、あるいは他の要因によるものであろう。

7.2 ワクチニアベクターによるワクチン注射

本発明において、ヒナドリを*E. tenella*由来の抗原で免疫する、より効果的な免疫方法を開発するため、モノクローナル抗体 6A5 (14図)により認識される分子量20,000のタンパクをコードする1.1kbのcDNA、及び、モノクローナル抗体 8A2 (18図)によって認識される分子量28,000のタンパクをコードしている1.1kbのcDNAを種痘ウィ

ルス内でクローン化して、ヒナドリに対するワクチン接種に用いた。詳細は以下に述べた通りである。

7.2.1 ベクターの調製

すべての組み換え体は、Mackettらによって述べられている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415 (1982)) ような、ウイルスのチミジンキナーゼ (TK) 部位での相対的遺伝子組み換えに基づくものであった。該TK部位は、種痘ウイルス由来の (遺伝子であって) Hind III によるJ断片上に位置づけられており、また、その断片の塩基配列が一部明らかにされている (Weir et al., J. Virol. 46:530 (1983))。

ベクター調製のため、種痘ウイルスのHind III によってできるJ断片を、pUC 8 (第24図a) でサブクローン化した。この構造物質をHpa IIで切断した。得られた断片を大腸菌のDNAポリメラーゼのクレノウフラグメント (クレノウ) で処理し、

Hind III で再び分解して、ウイルスのTK遺伝子をもつ断片をlow melting アガロースゲルから分離

上記のpUC8-TK断片に連結し、ベクターpUC8-TK-7.5K*を得た。この新ベクターをさらにBgl II及びEcoRIで分解した。

多様なクローニング部位をもつベクターを開発するため、上記の構造物に適当なポリリンカーを挿入した。この目的のために、M13tg131 (Amersham)

(第24図d) 中のポリリンカーが選ばれた。該ファージDNAをBgl II及びEcoRIに分解することによりポリリンカーフラグメントを単離し、前記pUC8-TK-7.5K*に挿入して、最終的にV.V.内での外来抗原の遺伝子組み換えのための基本となるベクター、即ちpUC8-TK-7.5Kがつくられた。

モノクローナル抗体BA2と結合する28キログルトンのタンパクをコードする遺伝子のEcoRIによってできるフラグメントには、該タンパクのN末端部分をコードする塩基配列は含まれていない。本来の返還開始コドンが失われている。

この欠失部位を補うため、2つの異なる構造を作製し、発現を試験した。まず、第1の構造として、形式上の開始コドンは、前記基本ベクター

した。分離した断片を、pUC 8 ベクター (第24図b) のHind III 認識部位と鈍角をなす端部 (S1処理による) のEcoRI認識部位に連結した。次に、Hind III により分解されたDNAをクレノウ処理し、ベクターフラグメントを再連結することによって、Hind III 認識部位を除去した。種痘ウイルスプロモーター (7.5K プロモーターといわれている) を挿入するため、該ベクターをCla I及びEcoRIで切断した。

V.V.由来の7.5K プロモーターは、そのウイルスDNAのSal Iにより得られる遺伝子フラグメントの中でも最小のもの1つの上に位置している (Venkatesan et al., Cell 25:805 (1981))。該フラグメントをM13mp8 (第24図a左) に組み込んでクローン化した。クローンは、転写方向がM13mp8 (第24図a左) のEcoRI認識部位に向かうように選択した。このDNAをSca I, Sma Iで切断し、Bgl IIの認識するリンカーを加えて再連結した (第24図b)。ウイルスプロモーター断片を含むEcoRI-Acc I による断片を、M13 構造物質から単離して、

pUC8-TK-7.5K (第24図c) 中のポリリンカーを一部削除することにより得られた。(即ち、) 該ベクターをEcoRV及びSma Iで分解し、ポリリンカーの一部を除去してから (第24図d)、連結させた。この操作によって、Sph Iの認識部位上に含まれるATGコドンは、EcoRI断片上ののう胞体由来のタンパクコード領域を正しく読みとれる位置に設けられた。(また、) この操作がうまくいったことは、新しくできたポリリンカーの遺伝子断片の塩基配列を調べることによっても確認された。こうしてできた塩基配列によりコードされるタンパクの予想アミノ酸一次構造を第25図Aに示す。

開始コドンのみでなく、欠失しているリーダー部位をも補うため、EcoRIによる遺伝子断片をマラリア抗原のリーダー部位の後のcorrect reading frame内につけた。リーダー部位単離のために採用されたマラリア抗原は、Ro-33 (Certa et al., EMBO J. 6:4137 (1987)) として記載されているような190キログルトンのタンパクであった。しかし、球虫類由来のリーダー部位のような、他の

リーダー部位を同じ目的に利用することはできなかったということを記しておかねばならない。

リーダー部位を含むDNA断片を単離するため、Ro-39 DNAを(まず) *Dra*Iで分解した。(次に、) *Pvu*II及び*Hind*IIIの認識部位をもっている断片を分離し、さらに、*Hind*IIIで分解した。本発明独自のベクターpUC8-TK-7.5K(第24図c)を*Sal*Iで切断し、クレノウフラグメントと共に処理してから*Hind*IIIで分解した。次いで、このベクターフラグメント内に、*Dra*I-*Hind*IIIによる断片から単離したマラリア抗原のリーダー部位をクローン化した。こうしてできた構造物を、*P. falciparum*由来の190kdタンパクと、モノクローナル抗体8A2によって認識され*Eco*RIによる遺伝子断片によりコードされている*E. tenella*の抗原との融合タンパクを発現するために用いた。該融合タンパクの、予想されるN末端一次配列を第25図Bに示す。

(上述のように、)28kダルトンのタンパクをコードする、*Eco*RIにより得られた断片を、基本ベクター(第24図c)内のポリリンカー上の*Eco*RIに

よる認識部位に組み込んでクローン化した。また、該断片を正しい向きに組み込んだ構造物を増殖させ、種痘ウイルスの遺伝子組み換えに用いた。

該(*Eco*RIによる)フラグメントを翻訳するための翻訳開始部位を基本ベクター内に組み込んだやり方から、組み換えにV.V.より発現するタンパクのN末端一次構造には、異なる2種類のものがあることが予想された。(第25図)考えられる第1の一次構造においては(第25図A)、オリジナルの配列に3個のアミノ酸(Met, Arg, Trp)が付加されただけのものだが、予想されるもう1つの一次構造においては、190kdのマラリア抗原のリーダー配列由来の、全部で47個のアミノ酸が、モノクローナル抗体8A2(第25図B)により認識されるポリペプチドのN末端に付加している。該リーダー配列部位がもつ解裂部位のプロセッシングによって、そのうちの19のアミノ酸が除かれ、N末端からVal, Thr, Hisで始まる成熟タンパクとなる。

*Eco*RIによって切り出された、モノクローナル抗体6A5により認識される20kダルトンの方のタ

ンパクをコードする遺伝子断片は、完全な塩基配列を含んでいる。該フラグメントは、補足的な操作なしで、上述のようにしてV.V.ベクターの*Eco*RI認識部位に組み込まれてクローン化された。

球虫由来の抗原をコードする上記遺伝子の組み換えによる一株のWR V.V.の調製は、組み換えウイルスの選別のための2つの過程を通してなされた。

まず、サルCV1細胞を、培地I(Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)、5%ウシ胎児血清(FCS; Amimed)、ペニシリン/ストレプトマイシン(各々100units/ml、100µg/ml)、2mMグルタミン Gibco)中、8cm培養プレートで80~90%に集密的になるまで培養した。培地を除去し、0.1プラーク形成単位(pfu)/細胞濃度の、温度感受性の種痘ウイルス株tsN7(Drillien et al., Virology 131:385(1983))を含むウイルス懸濁液で置きかえた。プレートを室温下で1時間おいてから、培地2mlを加え、33℃(このウイルスの生育許容範囲)で2時間、CO₂インキュベーター内で培養し

た(Kieny et al., Nature 312:163(1984))。

上記培養が終了する1時間半前に、DNAを含むリン酸カルシウム沈澱物を調製した。これは、HeBS緩衝液(280mM NaCl, 1.5mM リン酸水素ナトリウム、50mM HEPES)、200ngの精製WR V.V.のDNA、及び球虫由来の抗原をコードする遺伝子を含むプラスミドDNA 200ngを含み、全体量を0.55mlとした。DNAは各々1µlのTE緩衝液(10mM トリス-塩酸, pH7.5, 1mM EDTA)に加え、これにゆるやかにゆすりながら、0.55mlの250mM塩化カルシウムを滴加した。この混合液は、室温で20分間放置した。

2時間の培養終了後、プレートの培地を吸引し、上記のDNA含有カルシウム沈澱物0.25mlにおきかえて、室温下に1時間放置した。この後、培地Iを各々2mlずつ加えて、39.5℃、CO₂、湿度5%のインキュベーターで2時間培養した。(Kieny et al., supra)。この温度下では、tsN7ウイルスは複製され得ず、少なくともts7部位で組み換えが起こったウイルスが選別される。リン酸カルシウ

ムは、結果的には細胞の生育を阻害するので、2時間の培養後、培地を除去し、細胞を各回1mlのPBSでゆるやかにゆすりながら3回洗浄した。3回目の洗浄用PBSを吸引した後、培地Iを2mlずつ各プレートに加え、CO₂インキュベーター内で39.5℃の下2日間培養を続けた。

2日間の培養後、培養プレートを、培地及び細胞ごと-30℃で短時間処理し、さらに解凍した。プレート底部にまだ付着している細胞をはがし、この懸濁液を前述のように超音波処理した。このホモジェネートを第2の選別段階に供した。

本段階では、8cmプレート内ではほぼ集密的に近い生育をしているヒト143B TK細胞(ATCC CRL 8303)から培地を除去して、そのままか、もしくは、PBSで1:5または1:30(v/v)に希釈した上記ホモジェネート0.2mlでおきかえた。TK⁻細胞のウイルス感染を、室温下に1時間進めた。

前記培養後、0.1mg/mlのプロモデオキシウリジン(BudR, Sigman Chemical Co.)を含む半固体培地II(培地Iに非必須アミノ酸(Gibco; 注文番号

043-1140)、必須ビタミン(Gibco; 注文番号042-1120)、1%アガロースを加えたもの)2mlを細胞に加え、プレートを37℃下で16-24時間、CO₂インキュベーター内で培養した。これに0.2%の中性赤を含む上記半固体培地IIに重層し、さらに16-24時間培養した。すると明瞭に目視確認できる無色のブランクが現れるから、このブランク領域をパスツールピペットで吸引する(ブランク精製)ことによって、クローン性のウイルスが生じた。このようにして生じせしめたウイルスは、上記CV1細胞を宿主として培養し、143B TK⁻ cell上で第2、第3段階のブランク精製に供された。このようなブランク精製過程を経たウイルスを上記のように培養し、精製した。

組み換えウイルスにより球虫抗原が発現されるか否か調べるために、組み換えウイルスに感染した細胞を、卓上遠心機(Hettich Mikrorapid K, 100% 3分間, 20℃)で遠心し、ペレットをPBSで2回洗浄してから再び遠沈し、PBSに再懸濁した。該懸濁液を、顕微鏡用ガラスプレート(Flow)

にのせ、乾燥させた。また、もう1つの方法として、CV1細胞を顕微鏡用スライド(Miles Lab-Tek 4808)上で直接生育させ、ウイルスを感染させて1~2日間培養することもできた。その後、無培地下、PBSで細胞を洗浄し、室温で乾燥させた。さらに、細胞を固定するため、スライドを-30℃アセトン中に最低1時間沈めた後、室温で乾燥させた。

抗球虫抗原マウスモノクローナル抗体をPBSで希釈して、これを細胞が均等に液で覆われるようにスライド上にのせた。このスライドを湿潤チャンパー中に37℃で1時間おき、続いてPBSで数回洗浄した。スライドを乾かさずに、PBSで希釈した2次抗体(FITC標識抗マウスヤギIgG, Nordic)をスライド上にのせ、これを37℃で湿潤チャンパーに入れて1時間おき、抗体を反応させた。PBSで数回スライドを洗浄してから乾燥させた。こうしてできたスライドの上から20%グリセリン(v/v)溶液を2~3滴ピペットで落とし、その上にカバーガラス(Menzel 24×60)を上のにのせた。顕微鏡

下でこの試料の蛍光を、紫外線照射下でモニタリングした。(Zeiss ICM 405, F10 or Planapo 63 objective)

WRウイルスは、ほとんどあらゆる種の細胞中で増殖でき、増殖はブランク形成により確認できる。しかし、多くの場合、ウイルスを多量に調製するには、ヒナドリ胎児の線維芽細胞(CEF細胞)を用いた。

CEF細胞を得るために、発生後11日のヒナドリ胎児を卵中から分離し、四肢を除いて小片に切断し、0.25%トリプシン溶液(Difco)中に室温下で2時間再懸濁した。これを1容の培地Iで希釈し、cell sieve (Bellco, 150mesh)で濾過してから細胞を沈降させた(Hernie 卓上遠心機, 5分間, 2,000rpm, 室温)。細胞のペレットを当初の1/4の培地Iに懸濁し、このCEF細胞懸濁液を培養プレートに注入した。培養開始時の細胞濃度にもよるが、培養物は1~2日生育させ、直接もしくは1~2の過程を経た後、ウイルス感染用に供した。このような培養細胞の確立のための要領は、

Frehney, Culture of Animal Cells, Alan R. Liss Verlag, New York 1983, Chapter 11, p.99 にみることができる。

ウイルス感染のため、175 cm^2 培養フラスコ (Falcon 3028) 中で生育する80%~90%集密性のCEF細胞から培地を除去し、ウイルスを含むPBS溶液 (0.1pfu/cell, 0.01 ml/cm^2) 中で1時間、室温下で培養した (20℃) (PBS/Dulbecco, Animed)。次いで培地 I を添加 (0.2 ml/cm^2) し、37℃で2~3日、約80%の細胞が溶菌するまで培養した。こうしてできた保存溶液は、ウイルスの精製を行うまで、直接細胞及び培地とともに、当初の培養フラスコ中で-30℃下で保存した。

続いての (ウイルスの) 精製工程は、宿主菌に特異的な成分をもたないウイルス調製液を獲得するために用いられた。-30℃で保存していたウイルス感染後の培養細胞を解凍し、フラスコ表面に付着している残存細胞を、振とうしたりゆすったりして遊離させた。細胞及びウイルスを共に遠沈し、培地から分離した。細胞及びウイルス粒子の

ペレットをPBS (ペレットの体積 $\times 10-20$ 倍) 中に再懸濁し、上記と同様にして再遠沈させた。こうしてできたペレットを、10倍量のRSB緩衝液 (10 mM トリス-塩酸, pH8.0, 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2) に再懸濁した。

無傷の細胞を溶菌させ、該細胞の膜よりウイルスを放出させるために、上記懸濁液を超音波処理した (60ワットにて10秒 $\times 2$ 回, 室温下, Labsonic 1510 with 4 mm probe)。次に、この混合溶液をSorval GSA ローターで10℃下、3,000rpmで3分間遠心分離した。このようにして、核や巨大な細胞の残骸が除去されたウイルス懸濁液を調製した。上清は注意深く除き、ペレットをRSB緩衝液に再懸濁した後、超音波処理及び遠心分離を上記と同様に繰り返した。

2回目の遠心画分の上清を最初の上清と合わせて、10 ml の35%ショ糖溶液の上に重層し (Fluka, in 10 mM トリス-HCl, pH8.0) Kontron TST 28, 38/17 ローター (Beckman SW 27 analog) にて、10℃下で90分間、14,000回転で遠心分離した。上清

をデカンテーションし、ウイルス粒子のペレットを10 ml の10 mM Tris-HCl pH8.0 の緩衝液に再び溶かし、超音波処理により攪拌して (上述のように、室温で10分間 $\times 2$ 回)、以降の精製のため、ステップグラジエントにかけた。

ステップグラジエントはpH8.0, 10 mM Tris-HCl 中に各々以下の濃度、すなわち20%、25%、30%、35%、40%のショ糖を含む溶液を各5 ml ずつより構成した。これをKontron TST 28, 38/17型ローターで35分間、10℃下、14,000rpmで遠心分離した。ウイルス粒子を含む数本のバンドが30%~40%ショ糖濃度の域にみられた。グラジエント中のこの部分を探取し (10 ml)、PBS (20 ml) で希釈した後、ウイルス粒子を沈降させた (Kontron rotor, 90分間、14,000rpm、10℃)。こうして得られたペレットは、大部分ウイルス粒子よりなるものであった (OD測定とブランクアッセイにより判断。以下参照)。このペレットをPBSに溶かして、ウイルス濃度が平均1~5 $\times 10^8$ pfu/ ml となるようにした。このウイルスのstockは、直接そのまま、も

しくはPBSで希釈して用いた。

ウイルスstock中のウイルス濃度及び純度を測るため2つの方法を用いた。ウイルス粒子の絶対濃度は、分光光度計で該stockのODを測定することによって簡単に得られた。ここで、100/260 nm は、約 1.2×10^{10} 粒子/ ml の濃度に等しい [Jokli, Virology 18:9 (1962)]。また、ウイルス濃度は、60のウイルスのうち1粒子のみ感染能力があると仮定して細胞上のウイルスの力価を測定する (ブランクアッセイ) ことによっても得られた。

培養細胞におけるウイルス濃度を測定するため、CEF細胞を培地 I 中で8 cm^2 プラスチックプレート (Falcon) 上で生育させた。細胞が80~90%の集密性をもつに至った時点で培地を除去し、PBSで希釈したウイルス溶液0.2 ml でおきかえ、室温で1時間放置した。ウイルスのstock solutionは10倍毎に希釈した。室温下で培養した後、2 ml の半固体培地 (培地 I + 1%アガロース) を各プレートに添加し、CO₂ インキュベーター内で16~24時間

培養した。次いで、0.2%の neutral red (Fluka 72210)を含む半固体培地 I を生細胞染色のために重層し、さらに16-24時間培養した。染色されないブランクを顕微鏡下でカウントした。

7.2.2 ヒナドリの免疫

モノクローナル抗体 8A2や 6A5と特異的に結合する *E. tenella* 由来のタンパクをコードする遺伝子をもつ種痘ウイルスベクターが、病原性のある *E. tenella* 中のある株 (T2-750/7, T7-766/1, もしくは T6-771)の胞子形成されたのう胞体の投与に対し、(ワクチンとしてはたらくこと) ヒナドリに抵抗力を与えることができるかどうかを明らかにするため、以下のような試験を行った。

すべての試験はthe hatchery E. Wuthrich, Belp, Switzerland によって提供された。産卵鶏品種の cockerels を用いて行った。Day-old のヒナドリを加温したbattery-brooder 中で一定令まで飼育し、その後様々な試験区に分けたり、床が針金のケージ中で胞子虫症フリーの状態で育てたりした。試験全般を通じて、トウモロコシ、小麦や大豆粉

(粗タンパク21.7%)を基本とした業務用のbroiler-grower 飼料を与えた。

最初の試験では、体重が同程度のヒナドリを無作為に6個体ずつ3グループに分けた。3日後、ヒナドリに組み換え型もしくは野生型の種痘ウイルスを懸濁液 ($10^{1.0}$ pfu/ml in PBS) として、各々 $50 \mu\text{l}$ ずつ2回、右翼脰部皮下に注射することによって免疫した。2種類の組み換え型種痘ウイルスを用いたが、いずれも、モノクローナル抗体 8A2 型と特異的に結合する *E. tenella* 由来のタンパクをコードするDNA を含むものであった。該ウイルスの一方 (37K M3とする) は、190 キログルトンのマラリア抗原のリーダー遺伝子配列を有しており、もう一方 (37K K3とする) は、該リーダー遺伝子配列を欠いていた。種痘ウイルスの野生型であるWR株を陰性対照とした。

第1次接種から1週間後、追加接種を一定条件下左翼脰部に行った。ウイルスは、前回接種したものと同種のものを用いた。追加免疫から1週間後 (59日令時)、すべてのヒナドリから血液を2

mlずつ採取し、その血清画分は、特異的な抗体が存在するため、ELISA によって測定した。簡単に説明すると、マイクロタイタープレート (NUNC イムノプレート P96) のウェルを、*E. tenella* のスポロゾイト懸濁液 ($10,000$ cells/ml) でコーティングし、希釈率を増したヒナドリの血清と共に培養した。検出試薬として、抗ニワトリヤギ免疫グロブリン-西洋ワサビペルオキシダーゼconjugate (Kirkegaard and Perry Laboratory, Gaithersburg, U.S.A.) を、基質であるテトラメチルベンジジンとともに用いた。青色の発色をTitertek Multiskan MCC/340 MK II で、測定波長450nm で読み取った。抗体価は、バックグラウンドの最低2倍のODを与える血清の希釈率の逆数と定義した。

第1次注射より4週間後 (73日)、ヒナドリに50,000の胞子形成されたのう胞体を投与した。投与物は生理食塩水1mlに懸濁し、目盛付きシリンジについている鈍角な針で、嘴のう内に経口的に投与した。80日令時、ヒナドリをすべて屠殺し、解剖して、全体の病変度を得点で評価した (0点

=正常、1点=軽い病変、2点=中程度の病変、3点=深刻な発病、4点=胞子虫症により死亡)。ヒナドリの尿は発病cycleの末期2日間以上定量的に集め、糞便のサンプルにおいて、体外排出された胞子虫の数を測定した。結果を第7表に示す。

(本頁以下余白)

第 7 表
288D 蛋白を感染するワクチニアウイルスによる
45日令の鶏のワクチン注射

ウイルス	鶏の数	抗体力価	Cecal Lesion Score	毎日の接合子菌 の排出/鶏 ($\times 10^{-4}$)
37 K3	6	430	1.33	149
37 M3	6	1360	1.50	107
Wild-Type	6	200	2.67	271

a. ウイルス 37 M3株は、190キログルトンのマ
ラリア抗原のリーダー遺伝子配列を有していた；
37 K3 はこれを有していなかった。野生型ウイ
ルスはWR株であった。

b. 2匹のヒナドリは、胞子虫投与前に屠殺した。

第7表は、病変度のスコアが減少した点及び胞
子虫の体外排出が減少した点からみると、陰性対
照である野生型ウイルスと比較した場合、28キロ
グルトンのタンパクをコードしているDNA を有す
る2種のウイルスは、どちらも寄生虫に特異的な
抗体生産を誘導し、この胞子の投与前に比べてある
程度の抵抗力を与えたことを示している。胞子虫
に対する抵抗力という点においては、該2種のウ
イルスの効果は同等であるが、マラリア抗原のリ
ーダー遺伝子配列を有する方(37 M3株)は、胞子
虫の抗原に対しより高い抗体の力価を生ぜしめた。
これは標準的なウイルスの創造物(37 K3株) に対
し、融合した創造物は優位であることを示してい
る。

第2の試験においては、検体は上記と同様に飼

育し、免疫を行ったが、試験の開始はヒナドリが
22日令のときであった。100ml PBS中の 2×10^8
pfu のウイルスを投与した。用いたウイルスは、
28キログルトンのタンパクをコードするDNA を有
し、マラリア由来のリーダー配列をもたないもの
(37 K5を示す) もしくはもつもの(37 M19を示す)
とは異なるものであった。(前記試験と) 同じ野
生型のWR株を対照として用いた。一次接種後1週
間後もしくは2週間後、右翼明部に同量の追加接
種を行った。

57日目(一次接種より5週間後)、すべてのヒ
ナドリに50,000の胞子形成された胞子を投与
した。1週間後、ヒナドリを屠殺し、解剖して上
記と同様にして得点で評価を行った。感染時以降
の毎回の体重増加や、屠殺までの最後の2日間の
間の胞子虫の排出量も測定した。結果を第8表に
示す。

(本頁以下余白)

第 8 表
288D 蛋白を感染するワクチニアウイルスによる
22日令の鶏のワクチン注射

ウイルス	7-9週間 の時間 (週)	鶏の数	毎日の 重量増(g)	Cecal Lesion Score	毎日の接合子菌 の排出/鶏 ($\times 10^{-4}$)
37 K5	1	8	11.45	2.38	21.0
37 M19	1	8	15.61	2.13	24.0
Wild-Type	1	8	8.77	2.50	33.1
37 K5	2	8	5.14	2.25	22.3
37 M19	2	8	11.79	2.13	32.7
Wild-Type	2	8	8.34	2.63	37.0

a. ウイルス37 H19株は 190キログルトンのマリア抗原由来のリーダー配列を有していた。37 K5株にはこれがなかった。野生型のウイルスは、種痘ウイルスWR株であった。

第8表は、胞子虫のDNAを有する2種のウイルスは、野生型の対照ウイルスと比較した場合（ヒナドリ）、体重の増加や発病の度合いのスコアやのう胞体の排出といった点からみると、どちらも病原性を有するのう胞体の投与に対して、ある程度の抵抗力を生ぜしめることを示している。どちらのウイルスもほぼ同等の効果を及ぼした。第1次接種から1週間後に追加接種を行ったことで、幾分体重の増加や胞子虫の排出の減少が起こったが、発病度のスコアは、どちらの（時期の）追加接種の場合でも（1次接種から1週間後でも2週間後でも）ほぼ変わらなかった。

第3の試験では、3度のワクチン注射の効果について検討した。野生株の種痘ウイルス、もしくはモノクローナル6A5 に特異的に結合する20キログルトンのタンパクをコードするDNAを含むウイ

ルスの 3×10^8 pfu/ml 濃度の懸濁液を、50 μ l ずつ2本、21日令のヒナドリに接種した。28日令時に、すべてのヒナドリの左翼根部に同様の追加接種を行った。このうち、何個体かのヒナドリには、35日令時にさらにもう1度同様の追加接種を両翼の根部に行った。その他のヒナドリは、そのままさらなる追加接種を行わず、対照区とした。

42日令時、すべてのヒナドリから血液を採取し、前記のような寄生虫のスποロゾイト段階に特異的な抗体の存在を、ELISA によって測定した。49日令時（第1接種より4週間後）に、すべてのヒナドリに50,000の胞子形成されたのう胞体を投与した。それから1週間後、ヒナドリを屠殺し、解剖して全体の発病度を、前述と同様に得点で評価した。日々の体重増加を算出するために毎週体重を記録し、のう胞体の排出量を測定するため、感染サイクルの最後の2日間は、糞便を採取した。結果を第9表に示す。

（本頁以下余白）

第9表 20KD蛋白を発現するワクチニアウイルス注射 21日令の鶏のワクチン注射						
ワクチン注射の回数	鶏の数	抗体力価	毎日の 体重増(g)	Cecal Lesion Score	接合子虫の 排出/g糞 ($\times 10^{-6}$)	
rv	2	210	2.9	2.33	1.69	rv With Coccidial DNA WT Wild-Type N None
rv	3	7200	4.2	1.67	1.32	
WT	3	560	-4.1	2.67	2.09	
N	-	0	-3.8	2.83	1.75	

第9表のデータは、球虫特有の抗原を生産するウイルスを3回接種すると、スποロゾイトタンパクに特異的な抗体の力価が増加せしめられることを示している。さらに、このタイプの組み換えウイルスを用いると、どちらの処理でも、体重増加促進や発病度のスコアの減少及びのう胞体の体外排出の減少といった点からみて、のう胞体感染に対するある程度の抵抗力が与えられた。ワクチン接種していない対照区から得られた結果を比較すると、野生型の種痘ウイルスをワクチンとして接種しても抵抗力は生じなかったことがわかる。ゆえに、球虫由来のDNAをもつウイルスにより与えられる抵抗力は特異的なものであって、種痘ウイルスそのものにさらされたことに起因する一般的な免疫的刺激によるものではなかった。接種を3回行くと、2回の場合よりいっそう効果的であった。

当該技術分野における当業者にとっては明らかになるであろうように、本発明の修正されたものや多少変更されたものが、その思想や範囲から離

れることなしに数多く創造され得る。本文中に記載されている特徴的な具体的表現は、(実施)例を以て開示されており、本発明も同様のクレームの表現によってのみ制限を受けるべきものである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、*E. tenella* のスポロゾイト類のELISAの結果を示すグラフ、

第2図は、*E. tenella* のスポロゾイト類から可溶化させた蛋白質を用いて行なったウエスタン・ブロット検査の結果を示す電気泳動のパターン、

第3図は、*E. tenella* のスポロゾイト類、モロゾイト類および*E. tenella* のスポロゾイト類から可溶化させた蛋白質を用いて行なったウエスタン・ブロット検査の結果を示す電気泳動のパターン、

第4図は、*E. tenella* のスポロゾイト類の¹²⁵I-標識表面蛋白質類および生スポロゾイト類で免疫化させたマウスからの血清による¹²⁵I-標識スポロゾイト表面蛋白質類の免疫沈澱の結果を示す電気泳動パターン、

第5図は、モノクローナル抗体による¹²⁵I-標

のスクレオチド配列、

第15図は、第14図のスクレオチド配列から調製した蛋白質のアミノ酸配列、

第16図は、モノクローナル抗体7D1、7D4および20C6によって認識される65kd蛋白質をコードする1.7kb cDNA分子のスクレオチド配列、

第17図は、第16図のスクレオチド配列から推定され、発現された65kd蛋白質から調製されたトリプシンの蛋白質類の配列分析により確認された蛋白質のアミノ酸配列、

第18図は、モノクローナル抗体8A2によって認識される28kd蛋白質をコードする1.1kd cDNA分子のスクレオチド配列、

第19図は、第18図のスクレオチド配列から推定される蛋白質のアミノ酸配列、

第20図は、モノクローナル抗体7B2によって認識される蛋白質をコードする3.2kb cDNA分子のスクレオチド配列、

第21図は、第20図のスクレオチド配列から推定される蛋白質のアミノ酸配列、

識スポロゾイト表面蛋白質類の免疫沈澱の結果を示す電気泳動パターン、

第6図は、空気乾燥させた*E. tenella* のスポロゾイトの固体調製物類の相対比顕微鏡写真および各種のモノクローナル抗体類を使用する免疫蛍光検査の染色模様の顕微鏡写真、

第7図および第8図は、細胞内のスポロゾイト類の抗染色およびニワトリ腎臓細胞内に発育寄生生物の顕微鏡写真、

第9図は、抗スポロゾイト抗体類による細胞内のスポロゾイトの発育の中和を示すグラフを示し、

第10図は、65kd-β-ガラクトシダーゼ融合蛋白質試料または他の試料の電気泳動/ウエスタン・ブロット分析の結果を示すパターン、

第11図は、プラスミドpEV/2-4の模式的表示図、

第12図は、pEV3-SEGの地図、

第13図は、モノクローナル抗体6A5で認識される蛋白質をコードするcDNAクローンの制限地図、

第14図は、モノクローナル抗体6A5によって認識される20kb蛋白質をコードする1.1kb cDNA分子

第22図は、免疫アフィニティー精製された65kb蛋白質の電気泳動分析の結果を示すパターン、

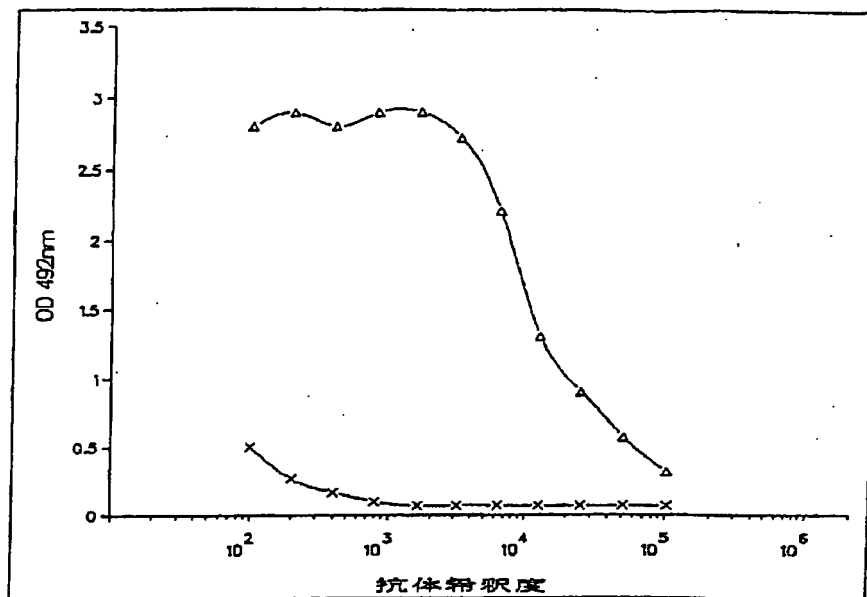
第23図は、65kb蛋白質のβ-メルカプトエタノール還元および未還元トリプシン消化のHPLC溶出曲線、

第24図は、ワクシニアウイルスへのコクシジア抗体類をコードする遺伝子の組換えに使用される基本ベクターの4種の要素の制限地図を示し、更に

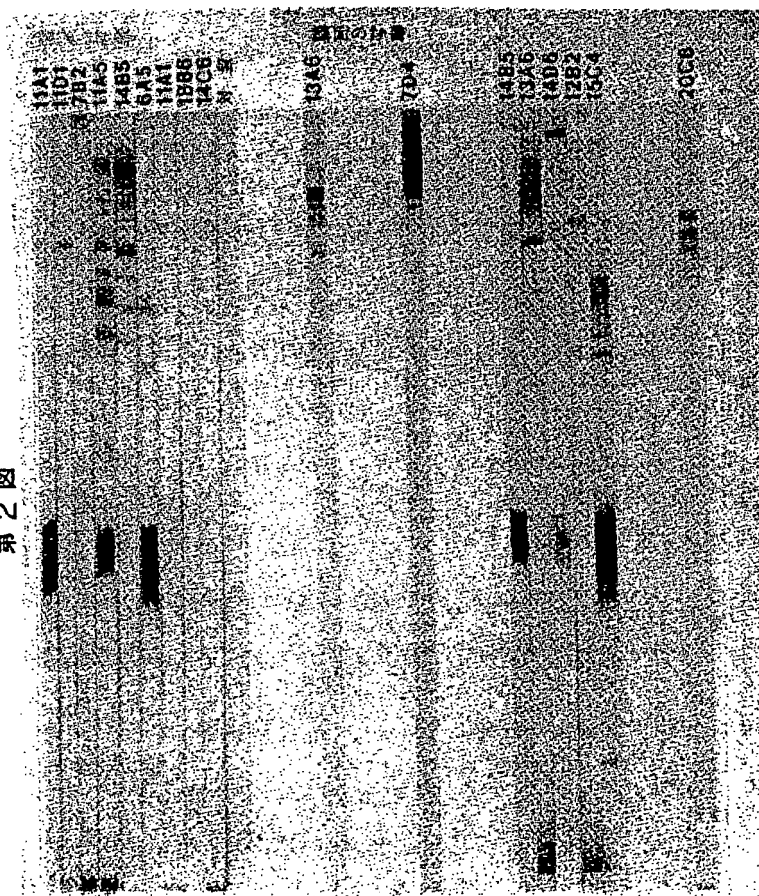
第25図は、モノクローナル抗体8A2によって認識されたアイメリア抗原のN-末端のアミノ酸配列を示す。

出願人 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・
コンパニー・アクチエンゲゼルシャフト
代理人 弁理士 平 木 祐 輔

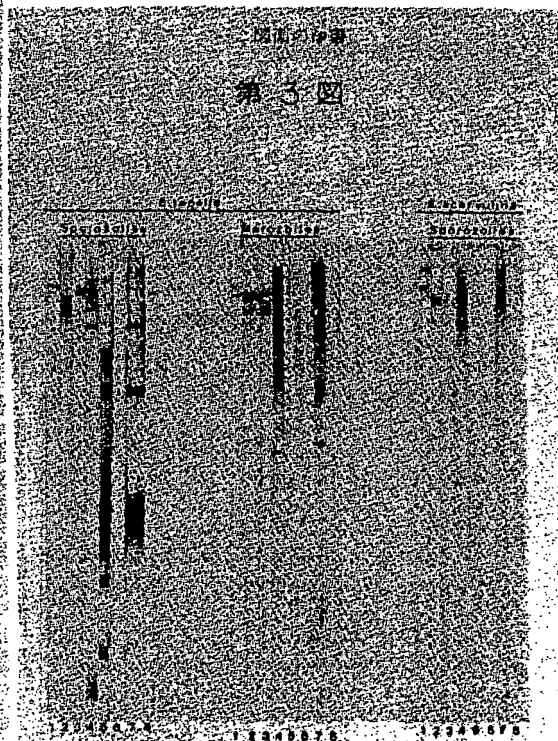
図面の添付
第 1 図

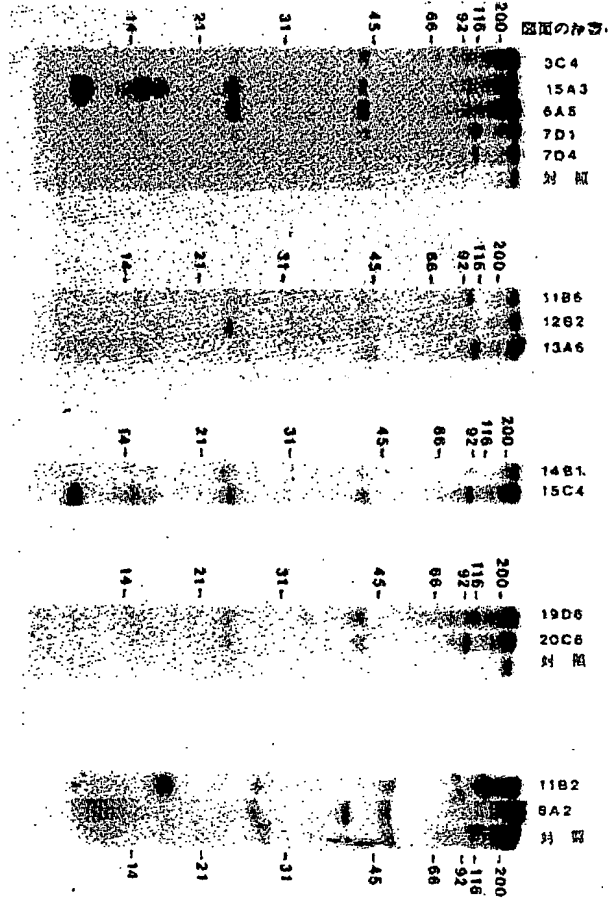
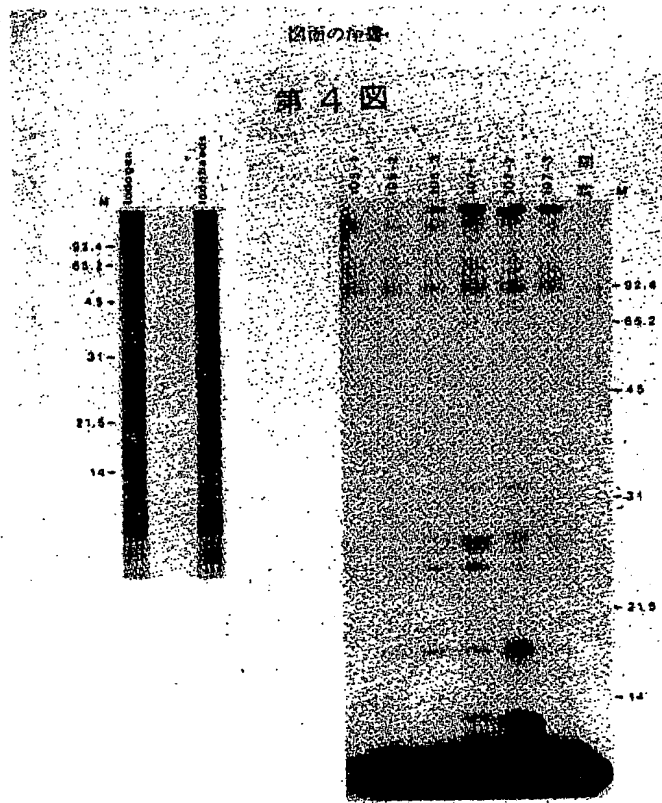


第 2 図



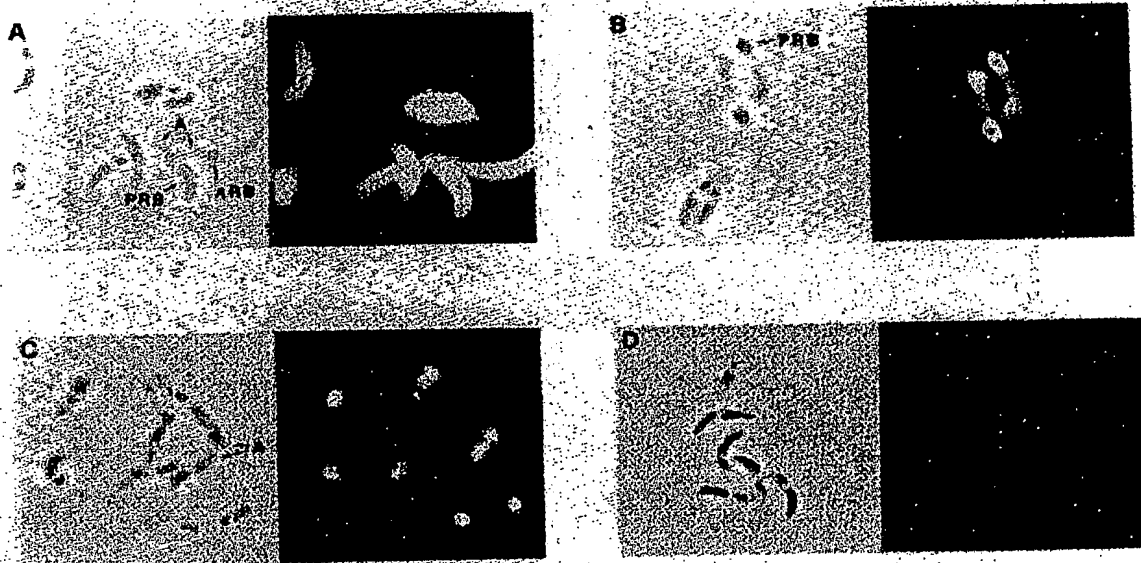
第 3 図





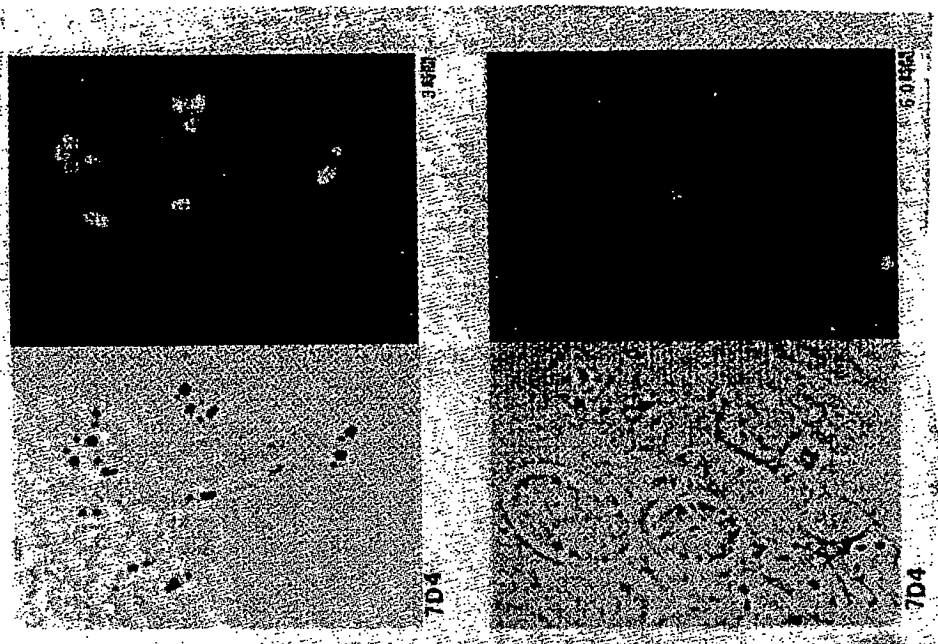
図面の位置

第 6 図

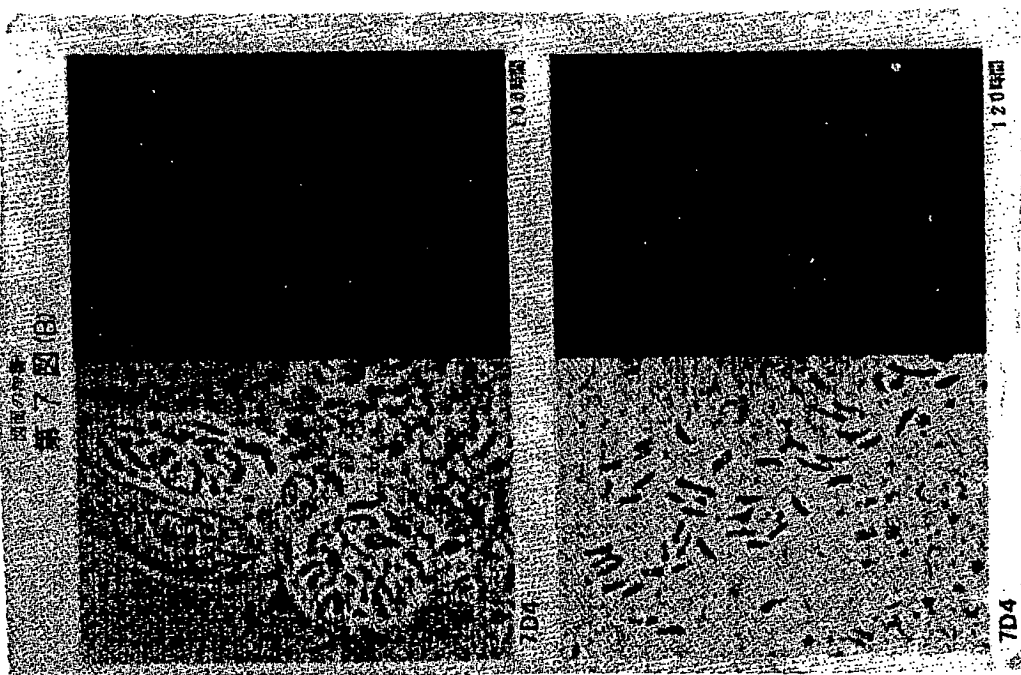


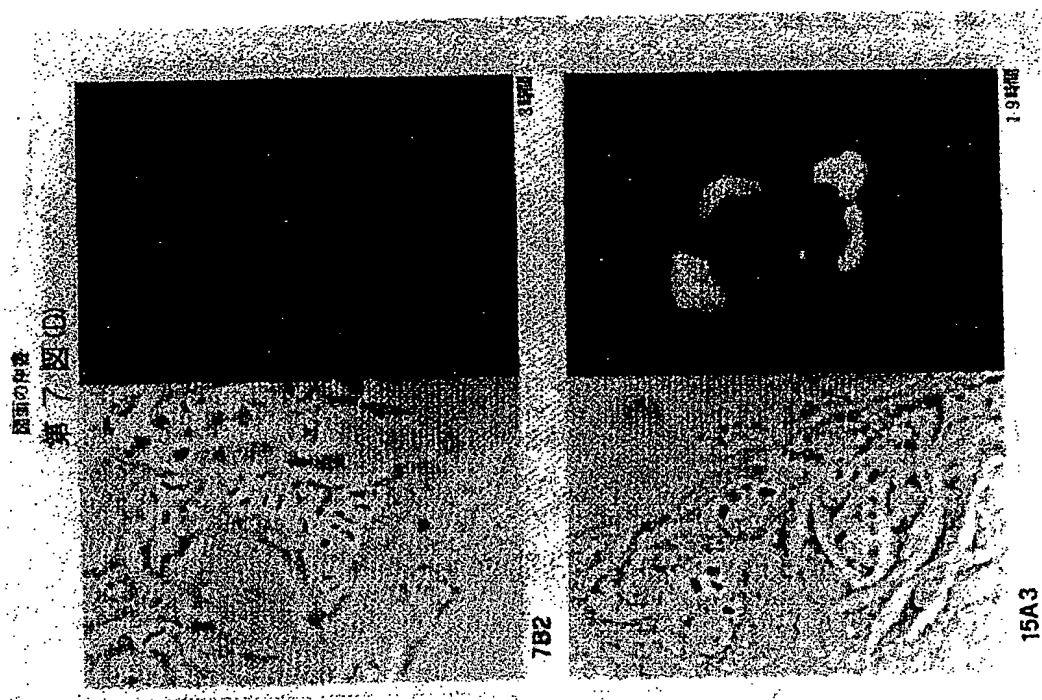
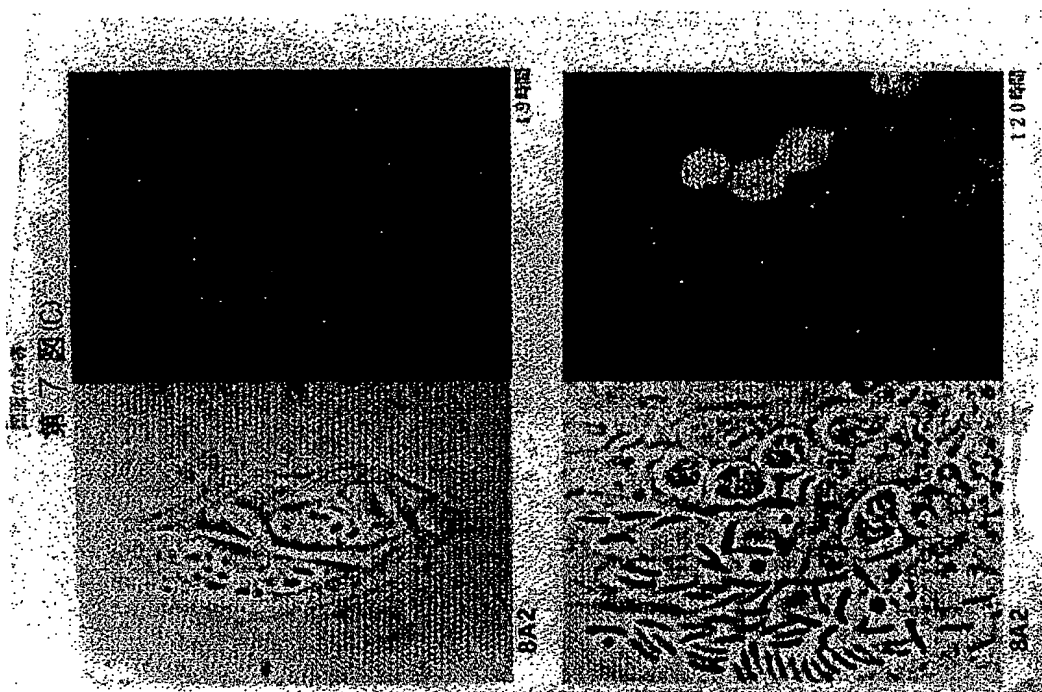
図面の符号

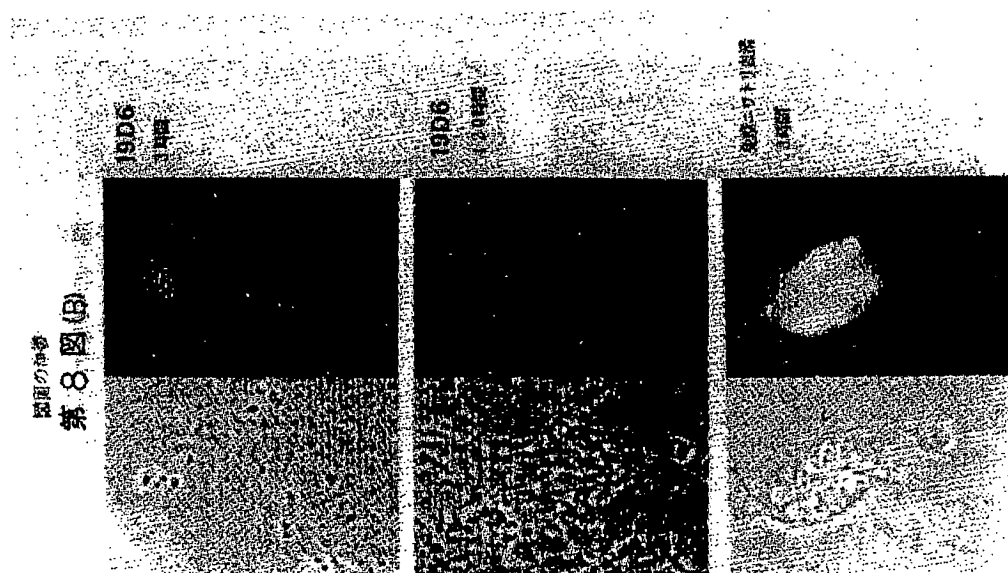
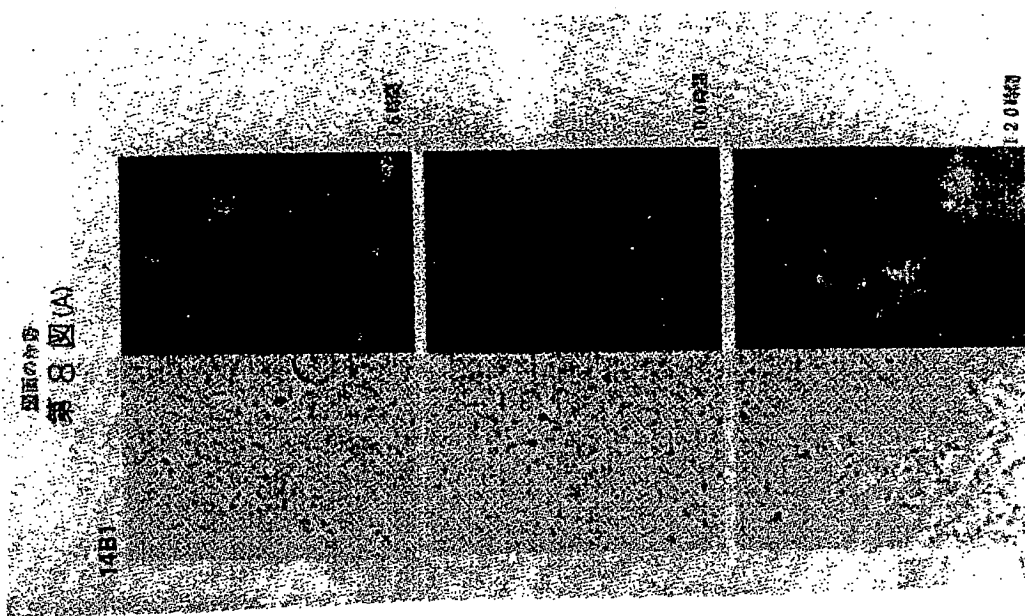
第7図(A)



第7図(B)

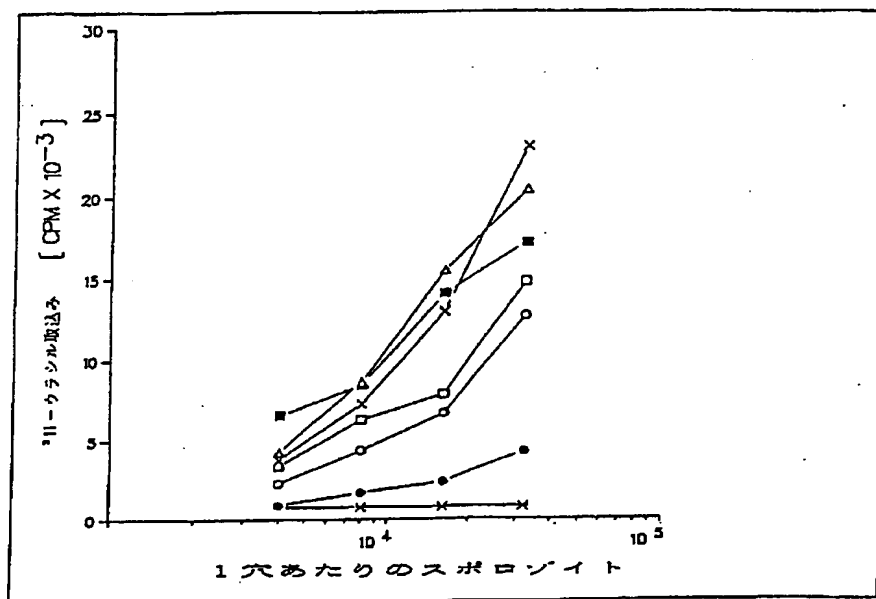






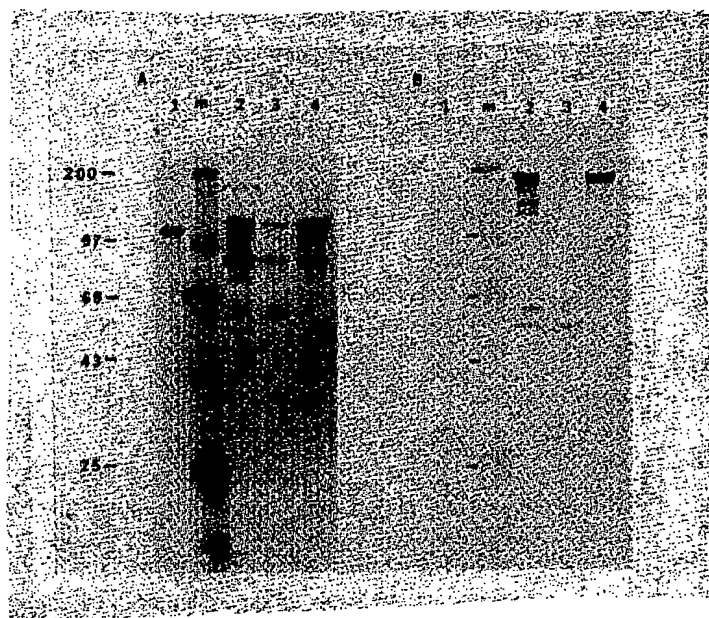
図面の添付

第 9 図

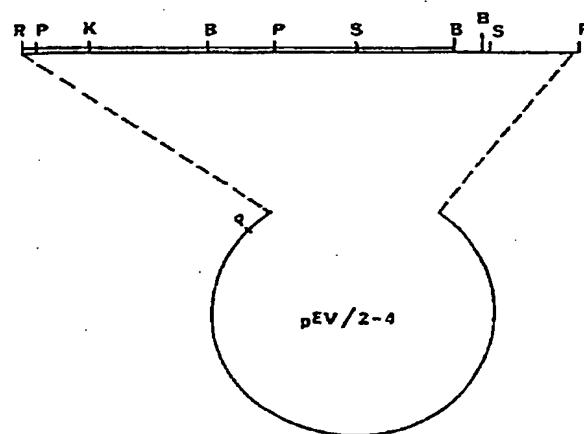


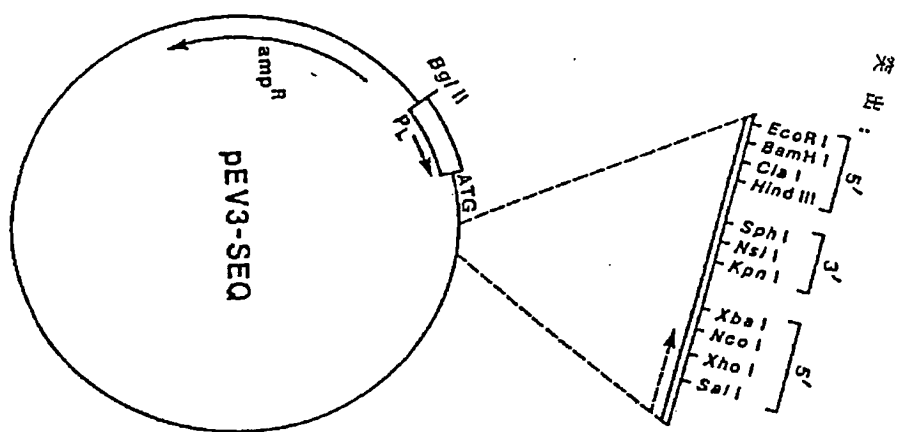
図面の添付

第 10 図



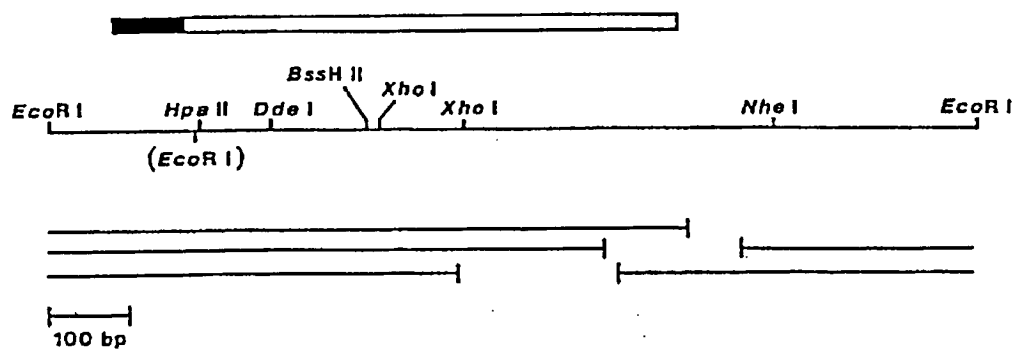
第 11 図





第12図

第13図



第14図(A)

```

10      20      30      40      50
GAATTCCTC CAATCTCTC GAACTCTCTC TCTCTCTCTC CAATCTCTC

60      70      80      90      100
GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

110     120     130     140     150
TCTCTCTCTC ACTCTCTCTC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC TCTCTCTCTC

160     170     180     190     200
TCTCTCTCTC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

210     220     230     240     250
GAACTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

260     270     280     290     300
TCTCTCTCTC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

310     320     330     340     350
GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

360     370     380     390     400
GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

410     420     430     440     450
ACTCTCTCTC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

460     470     480     490     500
AGCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

510     520     530     540     550
AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC TCTCTCTCTC GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC

560     570     580     590     600
GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

610     620     630     640     650
GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

660     670     680     690     700
GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

710     720     730     740     750
GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

760     770     780     790     800
AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

810     820     830     840     850
GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC GCGGCGGCGC

860     870     880     890     900
GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC GCGGCGGCGC AGCGGCGGCGC

```

第14図(B)

```

910      920      930      940      950
AGCAGGCTTA TGTAGGCGAG GCGGCGGCGC CAGCTGCGGC AGCAGGCGCA

960      970      980      990      1000
GCGGCGGCGC CAGGCGGCGC AGCTCTCTCTA GCGGCGGCTT GTGTCTTTTA

1010     1020     1030     1040     1050
TTAGCTTTGC AGCTCTCTAGG CCTCTCTCTCTA GCGGCGGCGC CTCAGGCTATC

1060     1070     1080
TTTCTCTCTA GGTCTCTCTAG AGCGGCTTCT

```

第 15 図

Met Ala Asp Leu Phe Ser Gly Leu Val 10 Gly Val Val Gly Ala Val Ala Ala Asp 20
 Leu Pro Ala Glu Gly Glu Arg Ala Pro 30 Arg Pro Ala Pro Gly Thr Ala Trp Thr Cys Cys 40
 Cys Ser Lys Leu Gln Glu Gly Ala Arg 50 Glu Leu Glu Gly Phe Val Gln Gln Leu Ser Phe 60
 Val Ala Gly Lys Leu Ala Cys Cys Leu 70 Arg Val Gly Ala Glu Gln Leu Ala Arg Cys Ala 80
 Ala Glu Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ser 90 Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Leu Leu Gln Leu 100
 Glu Lys Gln Asp Leu Glu Gln Ser Leu 110 Glu Ala Gly Lys Gln Gly Ala Glu Cys Leu Leu 120
 Arg Ser Ser Lys Leu Ala Leu Glu Ala 130 Leu Leu Glu Gly Ala Arg Val Ala Ala Thr Arg 140
 Gly Leu Leu Leu Val Glu Ser Ser Lys 150 Asp Thr Val Leu Arg Ser Ile Pro His Thr Gln 160
 Glu Lys Leu Ala Gln Ala Tyr Ser Ser 170 Phe Leu Arg Gly Tyr Gln Gly Ala Ala Ala Gly 180
 Arg Ser Leu Gly Tyr Gly Ala Pro Ala 190 Ala Ala Tyr Gly Gln Gln Gln Gln Pro Ser Ser 200
 Tyr Gly Ala Pro Pro Ala Ser Ser Gln 210 Gln Pro Ser Gly Phe Phe Trp 216

第 16 図

1 GAATTCATGT TTAGCGGAT TTGTTCAT GCAGGAAGC CCACCACCGG CTGCAAGTGS
 41 ACTGTACGGG GACACAGCTT TGGACACACA AGGCATTGCT GTGAGGAAA CTGCTTCGTG
 121 CACCGAAGC CCGTCCCTA TCGACGCAC GTCCGAGAA TGGACAGAT ACATGCGTG
 181 CTCCAGACT TCGGAGCGG GTACCCAGA GAGGAGAGG GAGCGTGTG TGGATATGC
 241 GCACACGGG GCGCGACCT GCATGAGCA GTATCTGAT GGGCCCATAT CCGTCAGGGA
 301 GTGCAACCC CAGCCGTGCC CTGTGACGA AGTAGTTGT GATTGGAAG ACTGGGGCA
 361 ATGCAGCAA CAGTGTGTG GCGCAAGCG GACTGTAAI CCGCGCCCAA GCAAGCAAGA
 421 GGCATGTC GAGGCAAGA CAGTTGCTCA ACAGAACGCA GAGCTTCTG AAGCGAGAA
 481 GATTGAGTG GTTCAGGAGG AAGGATGCAA TGAATTCCTA TCGGACCTT GCACGTCC
 541 CTTCAGTAG TGGACCGAAT GCGATGCTG CTCGCGCAT AGAACGAGG AATCGCAGT
 601 AGCATTTGAT TACACTGACA GAATGTGCG TGGTACACA CACGAGGTAC AAAGCTGTGA
 661 GGAATAGCT TCCAAATG CTGAGGAGG TGGTGAAGA GATGGGCGC CAGGAGAGG
 721 GACTGAGGC TCTGAGAGG AGGAGGAAA GAGGAGTCS AUTGATTTT CAAGTGCAGC
 781 TGTACCGGT GCGTGTGCTG GCGGATCTT CCGATTTCT GCGGAGCTG GAGCTTTTA
 841 TGGATTGAT GTTGGAGCG CCGCTGCTGC CACTGAGCA GGTGCTGAG TGGTGAAGA
 901 AGCTGUTACA TCCATGCTG CTGAGGTAGA AAGGAGAGC CTCATCATG CAGGTGACA
 961 ATCAGAGATG TGGCATCTT AATGAGAAC GTCCGCCCG CCGGTTTCA AAGGTGCGG
 1021 ATCTTGATA TCTGTGAGC AATTATTAC TACATCGAG CTCCTGACC TCCGTTGCG
 1081 AATCATTTA CCAAGCATCT CTGGGCATA GTTCTTGAA CAGAGACG CAGTGTCAA
 1141 CTGGGAGCA CTATATTG GAGGTGTGT GTTCAAGCA GAGGAGAGCA CAGGTGATG
 1201 TGTATGTTAG GTTGGGCGC CTGCTTCCG TTATTTATCC CATTTCCTC GCTTCATCT
 1261 TTCGCGTTC TCTGTGCGG CCGTATTG GTGTATTG GTGCTGCGG GACAGTAAAG
 1321 AGAGATTGCG GTATTGCA GCTGCGGAG CCGATGTTAG GGTGATGAA CACTGATG
 1381 TGAAGCGAA GCGACAGG CCGCTTTAC CTCTGTGCG TCAATGCGG AGCTGCTTC
 1441 TGTATCTGT TTCAAGGCG CCGTATGCG CAGCAGAGC TTCTGCCAGC
 1501 CAGCAGCAA TCGAAGAAC AATAGAGGA GTTCTGCTA ACGATTGTG GTAGTCATGA
 1561 TGTAGTAG GCTCCGTTT GAGATGAAT GAGCGGAGC AGCTGAGT AAGCTTGACT
 1621 CTCAGAGAG GCAATTC

第 17 図

⑥ SCLGGFCSMO ESPPPAAGGL YGGQTLEQQG IAVRLTASCS ENPCPIDATC GEWTEYSACS RTCGGGTQER
MNKNSTLGGF??MQ ④ ETAS7S ENP7PIDA??G

③ KREPWLDNAQ HGGRTCMEQY PDGPISVREC NTQPCPVDEV VGDWEDWGQC SEQCGGGKRT RNRGPSKQEA ①
KREPWLDNAQ RNRGPSKQEA

① MFGGKTVAQQ NAELPEGEKI EVVQEEGCNE VPCGPCTLPF SEWTECESCS GHRTRESAVA FDYTDRCMSG
MFGGKTVAQQ NAELP ⑦ ② ESAVA FDYTD

DTHEVQSCEE YCSQNAAGGA GGDGGAGGGT GGSGEEEGKE ESSGFPTAAV AGGVAGGVLA IAAGAGAFYG

LSGGSAAAAT EAGAEVMTFA GTSNAAEVEK ESLISAGEQS EMNAS

第 18 図 (A)

10 20 30 40 50
GANTCCCA CTTCGCGA GCGCGCGG GCTTCGCC CTCGAGCG

60 70 80 90 100
GCGCGCGG TCGTCGCG CCGTCGCG AGCGAGCG CCGTCGCG

110 120 130 140 150
GCTCGCGA CCGTCGCT GCGCTCGG CAGCACTCG GCGAGCGT

160 170 180 190 200
GAGGCGCG GAGCGCGG GCGAGCGG GCGGCGCG CAGGAGCG

210 220 230 240 250
CGCGAGCG GCGCGCGG CAGGAGCG GCGGCGCG TAGCGTCG

260 270 280 290 300
TGGCGCGG CAGCACTG CCGAGTCG AGAGAGAG AGGAGTGA

310 320 330 340 350
GAGCACTA TCGACTCG AAGCTCAA AGTTCGGA AAAACTCG

360 370 380 390 400
GAGGAGCG GAGCGCGG CCAATCAT CGAGCGCG GTTCAGAG

410 420 430 440 450
AGCGGCGT GCGCGCGT CAGCGCGA AGCTTCG TCGTTTCG

460 470 480 490 500
CGAGGAGG GCGGCGCG CTTAGCGG GTTGGCGG GCGCTCGT

510 520 530 540 550
CTCGCGCG CCGAGCGG AGCTTCG AGCGCGCG GAGTAAAG

560 570 580 590 600
AGCGGCGA GCGGCGCG CAGCGCGG GCGAGCGG GCGGCGCG

610 620 630 640 650
AGGAGCGG GAGGCTTG TTTCGATG TTTCGCGA GCGGCGCG

660 670 680 690 700
CTCGCGCG GTATCTAG GCGGCGCG GCGGCGCG TGTTCGCG

710 720 730 740 750
TTTCGATG TTTCGCGA AGAGAGCG AATTAACTG GCGAGTTC

760 770 780 790 800
CACTTTCG CTTTAAAG CCGCTTCG TCTTAACT GATTAACT

810 820 830 840 850
AGGCACTG TCGGCGCT CATTAATG CATTTCG CATTTCG

860 870 880 890 900
CATGAGCG TCGCGCGG TCTCTGCA CCGAGCG CTTGCTCG

第18図 (B)

910 920 930 940 950
GGGGGGGG TATTATAT TATTATAT TATTATAT TATTATAT
960 970 980 990 1000
TCAAAACAC AATGACAT TATTATAT AAAAAAGA TTAGGAAAT C

第19図

10 20
Glu Phe Pro Thr Ser Arg Glu Ala Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Lys Arg Arg Thr
30 40
Ser Leu Gly Ala Pro Ala Ala Gly Glu Gly Pro Leu Arg Arg Trp Glu Gln Pro Ala Ala
50 60
Gly Thr Ala Ala Ala Ile Arg Gln Gln Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Arg
70 80
Ala Ala Ala Ala Arg Ala Arg Thr Pro Gly Arg Ala Ala Val Gln Ala Arg Leu
90 100
Asn Ala Trp Val Ala Glu Gly Asn Lys Leu Pro Glu Ser Glu Arg Arg Arg Met Leu
110 120
Glu Gln Tyr Met Asn Leu Glu Lys Val Lys Lys Lys Leu Asp Glu Glu Ala
130 140
Glu Ala Arg Ala Lys Tyr Ile Glu Gly Gly Val Gln Lys Glu Pro Pro Leu Gly Ala Pro
150 160
Gln Gly Arg Lys Pro Phe Ala Ala Phe Cys Pro Glu Arg Gly Arg Arg Gly Leu Gln Ala
170 180
Val Arg Gln Gly Arg Ser Leu Cys Gly Ala Pro Gln Gly Glu Asp Ala Ala Gly Pro Gln
190 200
Glu Val Lys Gln Gln Gln Gln Gln Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gln Gly Arg Arg
210 220
Arg Arg Gln Gly Gly Phe Cys Phe Glu Leu Phe Arg Glu Arg Ala Glu Gly Ser Arg Gly
230 240
Val Cys Thr Ala Arg Glu Arg Gly Ser Cys Leu Gly Val Gly Phe Arg Leu Gln Lys
250 260
Thr Arg Ser Lys Leu Asn Trp Gln Lys Phe His Phe Ser Thr Leu Lys Cys His Phe Cys
Ser Leu Tyr

第20図 (A)

10 20 30 40 50
GAATTCGG CCGAGAGCT AAGGTGGCA AATATCTGG TCTGTGGCG
60 70 80 90 100
AAGTACCG CTGTGTGCT GACCTTCAG GAGCGAGGT TTGGACGCA
110 120 130 140 150
TTAGTCTG TTTTGGCA CTGCTGACC GGGCTTGGC CTGGGGCTGT
160 170 180 190 200
ACATGGCA CTCTGTGAC ATGACTGGCA TGGCTGACT GTTGGCTCT
210 220 230 240 250
TTCCAGGT TGTGTGCT TCCCGGCTA AAGTTGGGT TCGGAGCTT
260 270 280 290 300
CCACTCCCT GCTGGGCTG AGCGGCTTC CTCAGTCTTA GTCTGTGG
310 320 330 340 350
AGCTTACG GGGGTTTTC GTGGCGGTA TCACTTCAC CGATCAGTG
360 370 380 390 400
GTGCTGGCG CAAAGCTCA TGGATGAG GAGAGCGCT CATTGAGGT
410 420 430 440 450
TGGGAGCG CAGGTGTA ATAGTCAC TATGTGCG ATTTGGGTAC
460 470 480 490 500
TTGGGCTCT TTTTGGCT TCTGTGGCG ACTTACAG CAGCTTTC
510 520 530 540 550
CTTTAGTGA ATGCTGCTT GAGCATGCG CTGTGTTTC AGCTGGTGC
560 570 580 590 600
GGTATGCT GAGGTGACA TGGCGTGT GATCAGCTT CTGAATCTT
610 620 630 640 650
ATTGAGAT GGGTGGCT GCGATGCT TCAATGGA CAGCACTTG
660 670 680 690 700
CTATCATG CTGTGCTCT CAGCGTCA TCTGTGCA TCTGTCTTA
710 720 730 740 750
CATCATGCG AAGCGGCA ACGGAGTCT GTGATGCT GTTCTGCTG
760 770 780 790 800
GCTTGGAGA GCGGAGGAC GTTGGGCG CAGCGGCTCA GGGGCTTG
810 820 830 840 850
CAGCGGCA GGGGTGTA GGTGGGAC GATTTGCTG CTGGCGCA
860 870 880 890 900
AGTTTATC GTGCTGAT ACGGATGCG GTTGGAGG TCGGAGCG

第20図(C)

1810 1820 1830 1840 1850
 AGAGTACGA GTTACAGTCT GTTATACGAG GTCTCCAGGC ATACCGCGCC
 1860 1870 1880 1890 1900
 GTTATACGAG GTTTCAGCG GTCTCCAGAG GTTACAGAG CATCTATCAG
 1910 1920 1930 1940 1950
 TCTTCCAGCG GTTATACGAG CGGTAAAGT TTCTGTCTATC GTTCCCGGTG
 1960 1970 1980 1990 2000
 TTCTGTCTATC ACAGGCAAT TCTTCCCGCC ATGTCTTGGG TCCACAGTGA
 2010 2020 2030 2040 2050
 GTTCCCGAGG ATGTCCCGCT TCCAGTCTGT GAGGAGTGG ATCTTTCGG
 2060 2070 2080 2090 2100
 TCCAGTCTATC ATGTCTTTCG GATTCGAGGA GAGGAGTGA GTCTCTGGAG
 2110 2120 2130 2140 2150
 GATTCGAGG GAGGAGTCT GATTCATATC AGGAGAGCGA ATCCAGATG
 2160 2170 2180 2190 2200
 ATTCAGAGCA CATACAGCA GTTCAATGTC GTTATCTGTA CGGTCTCTAG
 2210 2220 2230 2240 2250
 TCAAGGAGCA GTTTCAGCA ACCTCATATC AGCCAGATG TTGGTTTCA
 2260 2270 2280 2290 2300
 TCAAGGCTTG GTTCCGTGTC GTTATCTTGG CATACAGATT CGGTGATGTC
 2310 2320 2330 2340 2350
 CGGTCCGCT GAGGAGGAGA CGTCCAGATT TCCGCTTAGG AGGAGAGAT
 2360 2370 2380 2390 2400
 TTCTGTCTAT GGTTCAGCTG TCAATGTGTC CAGAGGCAAT GAGACTCGCA
 2410 2420 2430 2440 2450
 TCCCATCTCA GGTTCAGTGG GTTCTCTCA TCAACATATG CATCTCTCT
 2460 2470 2480 2490 2500
 GAGGATCTTG GTTTCAGAG CATCTTCGCG ATCAACATG AGGAGAGAT
 2510 2520 2530 2540 2550
 CATACAGCA TTGTTCCAG TCAACAGAG TCCAGAGTGG TCCAGAGCAT
 2560 2570 2580 2590 2600
 CGGAGCGAGC TTCTGTCTATC AGGAGAGCTC CGGAGCGAG GATTCGCGCC
 2610 2620 2630 2640 2650
 CGGTTCAGC GTTTCAGAG ACCTCTGAG AGGCTGAGT CGTTCAGTCA
 2660 2670 2680 2690 2700
 AGGATCTCT TCCAGTCTAT TTCTTCCAGT GTTCTGTGTT GTTCTGTCG

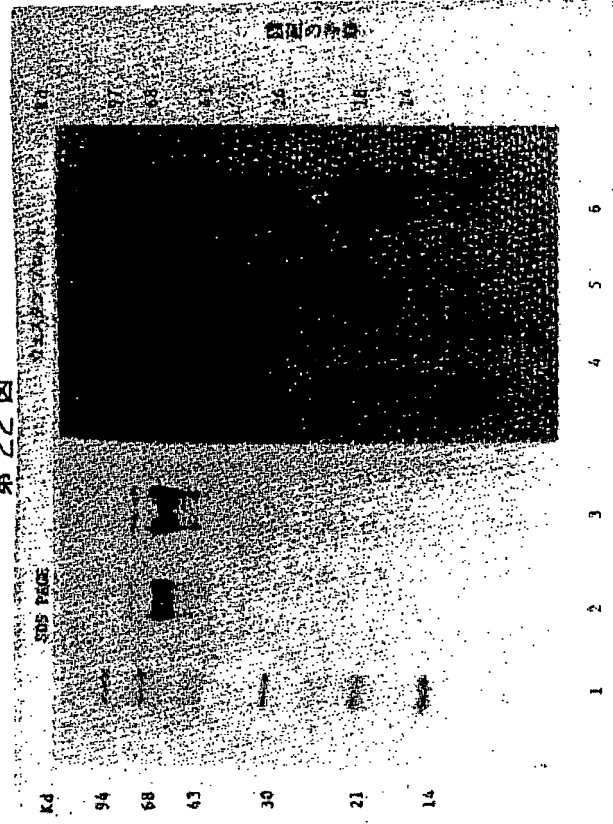
第20図(B)

910 920 930 940 950
 ACCTTCAGCA CATTCGAGG ATCTTACGGA ATCTCGTAT CAGCTGTGAT
 960 970 980 990 1000
 TTCCGATCC ATCTTATGTC TGTTCAGAG CGAGGCGACA TGAAGTCTCT
 1010 1020 1030 1040 1050
 CTCTCTGAG GTTATGTC GTTACAGAT TCTTACAGAG ATCTTACAG
 1060 1070 1080 1090 1100
 TCAACCGCA ATCTTATGTC TACAGATGTC TCTTGTGTT TCCAGGCGAG
 1110 1120 1130 1140 1150
 GAGGATCTCA ATCTTATGTC GTTTCAGGCA GATTCAGAG TCTTACAGAT
 1160 1170 1180 1190 1200
 CGGCTTATCA GAGGATGGA ATCTTATGTC GTTTCAGTCT TCCAGGCGAT
 1210 1220 1230 1240 1250
 CGGCTTATGTC TCAATGAGCC AGCATATGGA ATCTTATGTT CGATCTGAG
 1260 1270 1280 1290 1300
 ATCTTATGTC TCTTCTGTC ATCTTACAGG ATCTTATGTT TCCAGGCTCT
 1310 1320 1330 1340 1350
 CGGCTTATGTC ATCTTACAGG CGGAGCAAT CGGAGCATCT GCTTCCGCTG
 1360 1370 1380 1390 1400
 ATCTTATGTC ACCTTATGTC GTTTCAGTCT ATCTTACAGG ATCTTATGAT
 1410 1420 1430 1440 1450
 CGGCTTATGTT GGTTCATATC CATCTTATGCT GTTTCAGTCT TCCAGGCTCT
 1460 1470 1480 1490 1500
 CATCTTATGCT GTTTCAGTCT CATCTTATGCT GATCTTATGTC CGGAGCTGGA
 1510 1520 1530 1540 1550
 GAGGATGTC ATCTTATGTC ATCTTATGCT GTTTCAGTCT CGGAGATGTC
 1560 1570 1580 1590 1600
 GGTTCATGTC AGGAGATGTA CATCTTATGCT GGTTCAGTCT TCTTTCAGG
 1610 1620 1630 1640 1650
 CGGAGATGTA GTTTCATGTC ATCTTATGCT CATCTTATGCT GTTTCAGGCT
 1660 1670 1680 1690 1700
 GTTTCAGGCTCA TTCTTATGTC CGGATCTCTA GGTTCAGGCT CATCTTATGCT
 1710 1720 1730 1740 1750
 TACTTATGTC CGGAGATGTA CGGAGATGCT GTTTCATGTC TCCAGGCGCA
 1760 1770 1780 1790 1800
 AGGCTTATGTC GGTTCATGTC TCCAGGATGCT TTCTTATGCT AGGAGATGTC

第20図(D)

2710	2720	2730	2740	2750
CTGTGTGGG	GCTCTTGGC	ATTGTCTTG	ACCTGTGGA	GCTCAAGCAT
2760	2770	2780	2790	2800
TTGACTCTCC	TGGGCTTGT	TCTCATGTC	GGCTACTACT	GGTGTGGGC
2810	2820	2830	2840	2850
CGTTACCCCT	TGCTTCACA	CACCAITGAT	GTCTGTGAGC	AATGCCCTTT
2860	2870	2880	2890	2900
CGGGAGTCAT	TGTCATCGGC	TGCATGCTOG	AGTACGGAAC	CGCCATGATA
2910	2920	2930	2940	2950
TCGGGATTC	CTCTCTCGC	ACTCAITGA	ACCTTCTTGG	CTTCGGTCMA
2960	2970	2980	2990	3000
CGTTGCTGGT	GGATTCTTG	TAATCAGCG	CATGCTGAAG	ATGTTTCAGA
3010	3020	3030	3040	3050
TATAGGGGA	GAACCCCTT	GAGTTAATCT	TAATCAGAA	TAATCTTTT
3060	3070	3080	3090	
TCAATTGTAT	AAACCTGTAC	TGGTTGCAAA	AAAAAAGGA	ATTC

第22図



第21図(A)

20	Pro	Gln	Thr	Ala	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Val	Val	
30	Val	Thr	Phe	Thr	Glu	Ala	Gly	Phe	Gln	His	Tyr	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Ala
40																	
50	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Tyr	Ile	Ala	Gln	Ser	Val	Asn	Met	Thr	Glu
60																	
70	Leu	Val	Ala	Leu	Phe	His	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Ala	Ala	Val	Met	Val	Gly
80																	
90	Phe	His	Ser	Pro	Ala	Gly	Val	Glu	Arg	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu
100																	
110	Ala	Gly	Val	Phe	Val	Ala	Gly	Ile	Thr	Phe	Thr	Gly	Ser	Val	Val	Ala	Ala
120																	
130	His	Gly	Ser	Met	Glu	Ser	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	Pro	Gly	Arg	His	Ala	Leu
140																	
150	Thr	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Phe	Cys	Val	Ser	Ser	Gly
160																	
170	Arg	Met	Leu	Cys	Leu	Tyr	Val	Asn	Ala	Gly	Leu	Ser	Met	Trp	Leu	Gly	Phe
180																	
190	Ala	Ala	Ile	Gly	Gly	Ala	Asp	Met	Pro	Val	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
200																	
210	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Met	Leu	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Ile	Ile
220																	
230	Leu	Ile	Ala	Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Leu	Ser	Tyr	Ile	Met	Cys	Lys	Gly	Met
240																	
250	Leu	Trp	Asn	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ala
260																	
270	Gln	Gly	Ala	Val	Gln	Gln	Ala	Thr	Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Asp	Glu	Leu	Ala
280																	
290	Lys	Val	Leu	Ile	Val	Pro	Gly	Tyr	Gly	Met	Ala	Val	Ala	Arg	Cys	Gln	Ser
300																	
310	Asp	Ile	Ala	Lys	Asn	Leu	Met	Asn	Cys	Gly	Ile	Thr	Val	Asp	Phe	Gly	Ile
320																	
330	Ala	Gly	Arg	Met	Pro	Gly	His	Met	Asn	Val	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Asp	Val
340																	

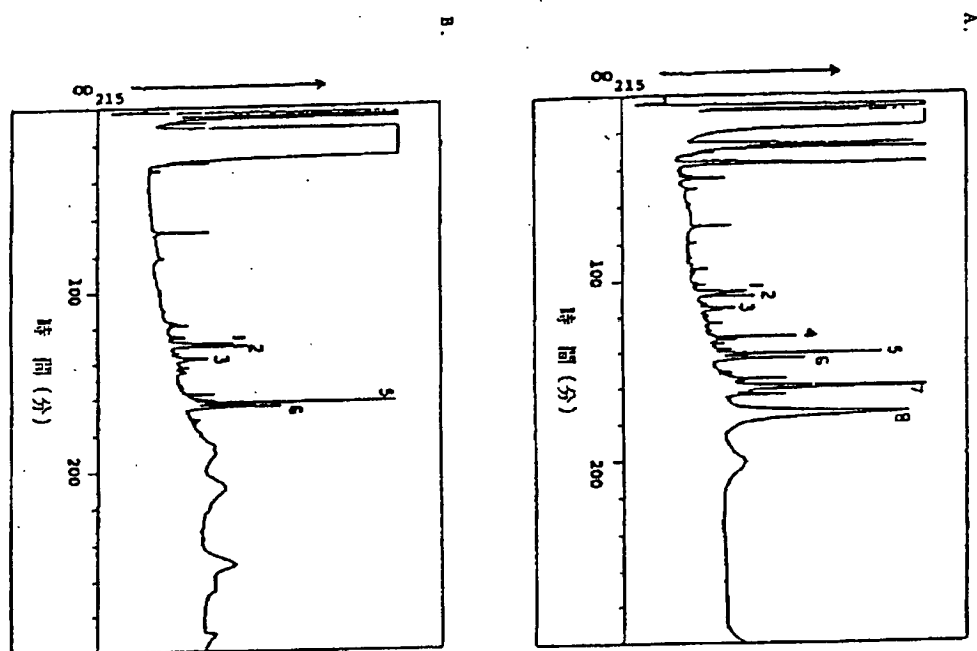
第21図(B)

Ile Val Lys Glu Met Ser Glu Val Asn Pro Glu Met Ser Ser Tyr Asp Val Val Leu Val 350 360
 Val Gly Ala Asn Asp Thr Val Asn Pro Ala Ala Leu Glu Pro Gly Ser Lys Ile Ser Gly 370 380
 Met Pro Val Ile Glu Ala Trp Lys Ala Arg Arg Val Phe Val Leu Lys Arg Ser Met Ala 390 400
 Ala Gly Tyr Ala Ser Ile Glu Asn Pro Leu Phe His Leu Glu Asn Thr Arg Met Leu Phe 410 420
 Gly Asn Ala Lys Asn Thr Thr Ser Ala Val Phe Ala Arg Val Asn Ala Arg Ala Glu Gln 430 440
 Met Pro Pro Ser Ala Ala Arg Asp Asp Leu Glu Ala Gly Leu Leu Glu Phe Asp Arg Glu 450 460
 Glu Arg Val Asp Pro Ser Ser Trp Pro Tyr Pro Arg Met Ala Val Gly Val Leu Arg Asp 470 480
 Ser Asn Gly Ser Val Met Val Ala Pro Lys Phe Val Pro Lys Leu Arg Lys Leu 490 500
 Ala Phe Arg Val Asn Val Glu Ser Gly Ala Gly Ala Asp Ala Gly Phe Thr Asp Glu Glu 510 520
 Tyr Arg Arg Ala Gly Ala Glu Val Leu Ser Gly Pro Asp Ala Val Ile Asn Gln Ser Gln 530 540
 Val Leu Leu Arg Val Ser Ala Pro Ser Pro Asp Leu Val Ser Arg Ile Pro Arg Asp Lys 550 560
 Val Leu Ile Ser Tyr Leu Phe Pro Ser Ile Asn Gln Gln Ala Leu Asp Met Leu Ala Arg 570 580
 Gln Gly Val Thr Ala Leu Ala Val Asp Glu Val Pro Arg Val Thr Arg Ala Gln Lys Leu 590 600
 Asp Val Lys Ser Ala Met Gln Gly Leu Gln Gly Tyr Arg Ala Val Ile Glu Ala Phe Asn 610 620
 Ala Leu Pro Lys Leu Ser Lys Ala Ser Ile Ser Ala Ala Gly Arg Val Glu Ala Ala Lys 630 640
 Val Phe Val Ile Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu Gln Ala Ile Ser Thr Ala His Gly Leu 650 660
 Gly Ala Gln Val ??? Gly His Asp Val Arg Ser Ala Thr Arg Glu Glu Val Glu Ser Cys 670 680
 Gly Gly Lys Phe Ile Gly Leu Arg Met Gly Glu Glu Val Leu Gly Gly Tyr Ala 690 700

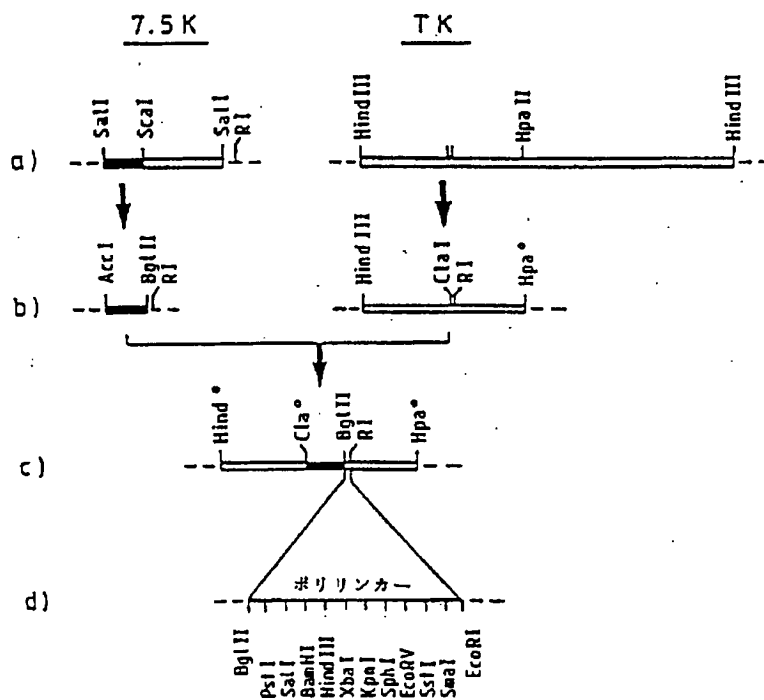
第21図(C)

Arg Glu Met Gly Asp Ala Tyr Gln Arg Ala Gln Arg Glu Met Ile Ala Asn Thr Ile Lys 710 720
 His Cys Asp Val Val Ile Cys Thr Ala Ala Ile His Gly Arg Pro Ser Pro Lys Leu Ile 730 740
 Ser Arg Asp Met Leu Arg Ser Met Lys Pro Gly Ser Val Val Val Asp Leu Ala Thr Glu 750 760
 Phe Gly Asp Val Arg Ser Gly Trp Gly Gly Asn Val Glu Val Ser Pro Lys Asp Asp Gln 770 780
 Ile Val Val Asp Gly Val Thr Val Ile Gly Arg Arg Ile Glu Thr Arg Met Pro Ile 790 800
 Gln Ala Ser Glu Leu Phe Ser Met Asn Ile Cys Asn Leu Leu Glu Asp Leu Gly Gly Gly 810 820
 Ser Asn Phe Arg Ile Asn Met Asp Asp Glu Val Ile Arg Gly Leu Val Ala Val Tyr Gln 830 840
 Gly Arg Asn Val Trp Gln Pro Ser Gln Pro Thr Pro Val Ser Arg Thr Pro Pro Arg Gly 850 860
 Gln Met Pro Pro Ser Ala Pro Gly Ala Pro Ala Pro Glu Lys Pro Gly Ala Phe Ala 870 880
 Gln Ala Leu Ala Ser Asp Ala Phe Phe Ala Met Cys Leu Val Val Ala Ala Val Val 890 900
 Gly Leu Leu Gly Ile Val Leu Asp Pro Val Glu Leu Lys His Leu Thr Leu Leu Gly Leu 910 920
 Ser Leu Ile Val Gly Tyr Tyr Cys Val Trp Ala Val Thr Pro Ser Leu His Thr Pro Leu 930 940
 Met Ser Val Thr Asn Ala Leu Ser Gly Val Ile Val Ile Gly Cys Met Leu Glu Tyr Gly 950 960
 Thr Ala Met Ile Ser Gly Phe Thr Leu Leu Ala Leu Ile Gly Thr Phe Leu Ala Ser Val 970 980
 Asn Val Ala Gly Gly Phe Phe Val Thr His Arg Met Leu Lys Met Phe Gln Ile 990

第23図



第24図



第 2 5 図

A

Met Arg Trp Glu Phe Pro Thr Ser Arg Glu Ala Pro Gly Ala Ser

B

Met Lys Ile Ile Phe Phe Leu Cys Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ile
 Asn Thr Gln Cys Val Thr His Glu Ser Tyr Gln Glu Leu Val Lys
 Lys Leu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Thr Ala Cys Asp Ile Glu Leu
 Ser Arg Glu Phe Pro Thr Ser Arg Glu Ala Pro Gly Ala Ser

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		8619-4H
C 12 N 1/21		6807-4B
15/30		
15/73		
C 12 P 21/08		8214-4B
// A 61 K 37/02	ABB	8615-4C
39/012	AFH	8829-4C
C 12 N 5/20		
15/06		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		
(C 12 N 1/21		
C 12 R 1:19)		
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

8717-4B C 12 N 15/00

B

⑫発 明 者	リチャード アントニ ー シゾナイト	アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07013 クリフト ン, パーンズデイル ロード 10
⑫発 明 者	リチャード アレン クレイマー	アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07052 ウェスト オレンジ, ノース エッジウッド アベニュー 9
⑫発 明 者	ピーター トーマス ロメデイコ	アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07043 アツパー モントクレア, クラブロード 53
⑫発 明 者	ステファン ジエイ. マックアンドリユー	アメリカ合衆国 オハイオ州 45701 アテンス, セカン ドストリート 95

手続補正書 (方式)

平成元年10月20日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第140268号

2. 発明の名称

組換えコクシジウム症ワクチン類

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 スイス国 バーゼル・グレンツァーヘルストラッセ
124-184

名 称 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アーゲー

代表者 ジャン・ジャック・オゲイ

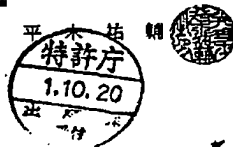
同 ローランド・ボラー

国 籍 スイス国

4. 代理人

住 所 東京都港区虎ノ門1丁目15番7号
TC115ビル7階

氏 名 (9109) 弁理士 平木 祐 晴



5. 補正命令の日付

平成1年9月26日 (発送日)

6. 補正の対象

① 明細書の図面の簡単な説明の欄

② 図面の第1図、第2図、第3図、第4図、第5図、第6図、第7図(A)、第7図(B)、第7図(C)、第7図(D)、第8図(A)、第8図(B)、第9図、第10図、第22図。

7. 補正の内容

① 明細書の第173頁の第6行に「の顕微鏡写真、」とあるを、「の顕微鏡写真、なお、第6図は生物の形態を示すものである。」に訂正する。

② 別紙の通り。

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分
 【発行日】平成 9 年（1997）4 月 28 日

【公開番号】特開平 3-7594
 【公開日】平成 3 年（1991）1 月 14 日
 【年通号数】公開特許公報 3-76
 【出願番号】特願平 1-140268
 【国際特許分類第 6 版】

C12N 15/09
 A61K 39/012 AFH
 C07K 14/44
 C12N 1/21
 15/02
 C12P 21/02 ZNA
 21/08
 // C12N 5/10
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)
 (C12P 21/08
 C12R 1:91)

【 F I 】
 C12N 15/00 A 9162-4B
 A61K 39/012 AFH 9284-4C
 C07K 14/44 8517-4H
 C12N 1/21 8828-4B
 C12P 21/02 ZNA C 9452-4B
 21/08 9358-4B
 C12N 15/00 C 9162-4B
 5/00 B 9281-4B

手 続 補 正 書

平成 8 年 3 月 1 8 日

特許庁長官 清 川 佑 二 殿

1. 事件の表示

平成 1 年特許願第 1 4 0 2 6 8 号

2. 発明の名称

組換えコクシジウム症ワクチン類

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー

4. 代 理 人

住 所 東京都港区虎ノ門 2 丁目 7 番 7 号

虎ノ門中田ビル 2 階

氏 名 (9109) 弁理士 平 木 祐 輔



5. 補正の対象

特許請求の範囲および発明の詳細な説明の欄

(12) 請求項 5 に記載の形質転換宿主生物が前記組換えベクター中に含まれる請求項 1 に記載の蛋白質をコードする DNA 配列を発現することができる。

(13) 請求項 6 に記載の抗体がモノクローナル抗体である。

(14) 前記モノクローナル抗体が ATCC 番号 HB 9707、HB 9708、HB 9709、HB 9710、HB 9711 および HB 9712 より成る群から選ばれるものである。

(15) 請求項 1 に記載の蛋白質がコクシジウム症に対する家禽の免疫感作に用いられる。

(16) 請求項 1 に記載の蛋白質がコクシジウム症から家禽を防衛し得るワクチンの調製に用いられる。

(17) 請求項 1 に記載の蛋白質が請求項 7 に記載の方法により調製されたものである。

(18) 請求項 5 に記載の形質転換宿主生物が請求項 8 に記載の方法により作製されたものである。」

5. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙のように補正する。

(2) 明細書第 172 頁第 4 行目と第 5 行目の間 (すなわち、図面の簡単な説明の上) に次の文を挿入する。

「なお、本発明は以下の実施態様を包含するものである。すなわち、

(1) 請求項 1 に記載の蛋白質が第 15 図に示されたアミノ酸配列を有するか、またはその機能的に均等なものである。

(2) 請求項 1 に記載の蛋白質が第 17 図に示されたアミノ酸配列を有するか、またはその機能的に均等なものである。

(3) 請求項 1 に記載の蛋白質が第 19 図に示されたアミノ酸配列を有するか、またはその機能的に均等なものである。

(4) 請求項 1 に記載の蛋白質が第 21 図に示されたアミノ酸配列を有するか、またはその機能的に均等なものである。

(5) 請求項 2 の DNA 配列が第 14 図に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を含むものである。

(6) 請求項 2 の DNA 配列が第 16 図に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を含むものである。

(7) 請求項 2 の DNA 配列が第 18 図に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を含むものである。

(8) 請求項 2 の DNA 配列が第 20 図に示されたヌクレオチド配列の全部または一部を含むものである。

(9) 請求項 3 に記載の組換えベクターが適合性の宿主生物において前記 DNA 配列の発現を導くことができる。

(10) 請求項 3 に記載の組換えベクターが *pl* col1 ベクターである。

(11) 請求項 3 に記載の組換えベクターが *pEV*/2-4 である。

(別紙)

請求の範囲

1. 表面抗原が約 28kd、37kd、120kd または 200kd 以上の見かけ分子量を有し、かつアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されて受託番号 HB 9707 から HB 9712 を指定されたモノクローナル抗体の 1 つ以上に特異的に結合する、アイメリア (Imeria) 表面抗原の免疫反応性および/または抗原性の決定基を 1 つ以上有する蛋白質。

2. 請求項 1 に記載の蛋白質をコードする DNA 配列。

3. 請求項 2 に記載の DNA 配列を含む組換えベクター。

4. ボックスウイルスベクターである、請求項 3 に記載の組換えベクター。

5. 請求項 3 または 4 に記載の組換えベクターで形質転換された宿主生物。

6. 請求項 1 に記載の蛋白質に対する抗体。

7. 請求項 1 に記載の蛋白質の調製方法であって、

(a) 該蛋白質をコードする DNA 配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主生物を、該 DNA 配列が発現される条件下において培養し、そして

(b) 上記の培養物から該蛋白質を単離する、ことを含んでなる方法。

8. 公知の方法を用いて宿主生物を請求項 8 または 4 に記載の組換えベクターで形質転換することを含んでなる、請求項 5 に記載の形質転換宿主生物の作製方法。

9. 請求項 1 に記載の蛋白質 1 種以上および生理学的に許容しうる恒体を含有する、コクシジウム症から家禽を防衛するためのワクチン。

10. 請求項 4 に記載の組換えボクスイルスベクターを含有する、コクシジウム症から家畜を防御するためのワクチン。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)